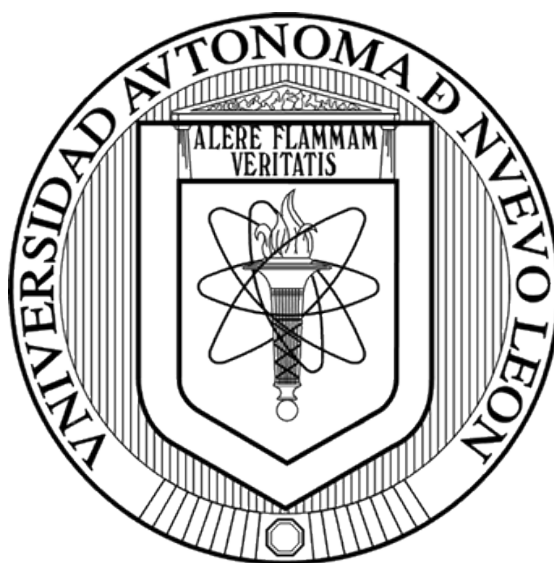


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**INMUNOPATOGÉNESIS TEMPRANA EN EL CEREBRO DURANTE LA
CANDIDOSIS DISEMINADA NEONATAL MURINA**

POR

Q.B.P. JUAN FRANCISCO ENRÍQUEZ BAÑUELOS

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA MÉDICA**

Noviembre, 2021

**INMUNOPATOGENESIS TEMPRANA EN EL CEREBRO DURANTE LA
CANDIDOSIS DISEMINADA NEONATAL MURINA**

Aprobación de la Tesis:



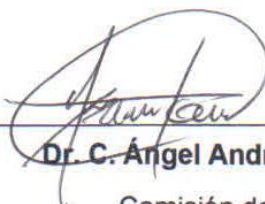
Dr. C. Miguel Ángel Becerril García

Director de tesis




Dra. C. Gloria María González González

Co-Director de tesis



Dr. C. Ángel Andrade Torres

Comisión de tesis



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez

Sub-Director de Estudios de Posgrado

**INMUNOPATOGENESIS TEMPRANA EN EL CEREBRO DURANTE LA
CANDIDOSIS DISEMINADA NEONATAL MURINA**

PRESENTADO POR:

Q.B.P. JUAN FRANCISCO ENRÍQUEZ BAÑUELOS

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología Experimental y el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas, ambos pertenecientes al Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. C. Miguel Ángel Becerril García.



Dr. C. Miguel Ángel Becerril García

Director de tesis

**INMUNOPATOGÉNESIS TEMPRANA EN EL CEREBRO DURANTE LA
CANDIDOSIS DISEMINADA NEONATAL MURINA**

**Q.B.P. JUAN FRANCISCO ENRÍQUEZ BAÑUELOS FUE BECARIO DEL
CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT) CON EL
NÚMERO DE REGISTRO 1002911**

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. C. Miguel Ángel Becerril García por su confianza y paciencia para la realización de este proyecto, por su atención y consejos que son y seguirán siendo de gran utilidad.

A la Dra C. Gloria María González González, también por su confianza en nosotros al habernos recibido en este departamento, por haber sido parte de mi comisión de tesis, y por su gran apoyo a todos los alumnos del posgrado.

Al Dr C. Ángel Andrade Torres también por haber sido parte de mi comisión de tesis, y en general por mostrar un interés genuino al preguntarme como voy, como estoy o que sigue.

A todos los doctores que nos impartieron cursos por ayudarnos a ir más allá.

A CONACYT por su confianza al haberme otorgado una beca que me sustentó durante todo este tiempo.

A mis compañeros de posgrado: Felipe, Luis Contreras, Lizeth Sánchez, Wilson, Joan, Sergio, Oscar, Anita, Gerardo, Martín, Caro, Luis Cortez, Gabriel y Orlando. En especial a Lizeth de Anda, por que sabemos que la vida se arregla sola 😎.

A mis compañeros de Laboratorio: Orlando, Luis y Bere por toda la ayuda brindada. En especial a la Q.B.P. Liliana Guadalupe Olvera Quijano por todas las desmañadas y fines de semana sacrificados, y por su gran apoyo en general.

A mi Señora, por su gran esfuerzo tan grande y sacrificios que hicieron posible este proyecto.

DEDICATORIA

A nuestro Dios

A nuestra familia de 3: 🐼 🐕 🧑

A los que están por venir

A nuestros padres y hermanos

Leidy Jazmín Guzmán Morales

“Porque por mi Espíritu los iluminaré, y por mi poder les revelaré los secretos de mi voluntad; sí, cosas que ojo no vio, ni oído oyó, ni han llegado siquiera al corazón del hombre.” D. y C. 76:10

ÍNDICE

SECCIÓN	PÁGINA
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Generalidades de <i>Candida. albicans</i>	1
1.2. Candidosis.....	2
1.3. Candidosis invasiva neonatal.....	4
1.4. Sistema inmune neonatal.....	6
1.5. Modelo de candidosis diseminada neonatal murina.....	8
1.6. Inmunopatogénesis cerebral durante la candidosis.....	10
1.7. Estudios sobre la inmutogénesis cerebral en modelos neonatales.....	12
2. JUSTIFICACIÓN	17
3. HIPÓTESIS	18
4. OBJETIVOS	19
5. MATERIAL Y MÉTODOS	20
5.1. Animales de experimentación.....	20
5.2. Lote de trabajo de <i>C. albicans</i> y activación de la cepa.....	21
5.3. Preparación de los inóculos.....	22
5.4. Infección sistémica en ratones recién nacidos.....	23
5.5. Cinética de peso.....	23
5.6. Determinación de carga fúngica.....	24
5.7. Análisis histológico.....	25
5.7.1. Fijación.....	25
5.7.2. Deshidratación.....	25
5.7.3. Aclaramiento.....	26
5.7.4. Inclusión.....	26
5.7.5. Cortes histológicos.....	26
5.7.6. Desparafinación.....	27

5.7.7. Tinción con ácido peryódico de Shift (PAS).....	27
5.7.8. Tinción con Hematoxilina y Eosina (H&E).....	28
5.7.9. Montaje y microscopía.....	29
5.8. Análisis por citometría de flujo.....	29
5.8.1. Suspensión celular.....	29
5.8.2. Activación de la microglía.....	30
5.8.3. Muerte celular.....	32
5.9. Análisis estadístico.....	33
6. RESULTADOS.....	34
6.1. Medición del peso de ratones neonatos con candidosis diseminada.....	34
6.2. Invasión de <i>C. albicans</i> e infiltración celular en el cerebro de ratones recién nacidos.....	36
6.3. Análisis semicuantitativo del grado de invasión fúngica e infiltración celular en diferentes regiones y subregiones anatómicas del cerebro de ratones recién nacidos con candidosis diseminada.....	39
6.4. Activación de la microglía en el cerebro de ratones con candidosis diseminada neonatal.....	42
6.5. Muerte celular en el cerebro de ratones neonatos con candidosis diseminada.....	45
7. DISCUSIÓN.....	49
8. CONCLUSIONES.....	60
9. PERSPECTIVAS.....	61
10. BIBLIOGRAFÍA.....	62

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Mecanismo de daño cerebral causado por hipoxia-isquemia en recién nacidos.....	16
2. Efecto de la candidosis invasiva en el peso de ratones recién nacidos.....	35
3. Invasión de <i>C. albicans</i> e infiltración celular en el cerebro de ratones neonatos.....	37
4. Regiones y subregiones analizadas del cerebro de ratones menores de 24 horas de edad.....	40
5. Estrategia para la selección de las poblaciones celulares de interés.....	43
6. Activación de la microglía durante la candidosis diseminada neonatal.....	44
7. Muerte celular necrótica y apoptótica en el cerebro de ratones recién nacidos con candidosis invasiva neonatal.....	47

LISTA DE TABLAS

TABLA	PÁGINA
1. Anticuerpos utilizados para la clasificación de la microglía.....	31
2. Comparación del grado de invasión fúngica en las diferentes subregiones anatómicas del cerebro de ratones recién nacidos con candidosis diseminada.....	41
3. Comparación del grado infiltración en las diferentes subregiones anatómicas del cerebro de ratones recién nacidos con candidosis diseminada.....	42

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades de *Candida albicans*

Candida es un género de hongos perteneciente a la familia Saccharomycetaceae, orden Saccharomycetales, subphylum Ascomycotina, phylum Ascomycota ¹. Comprende alrededor de 200 especies de las cuales entre 30 y 60 son de importancia clínica siendo la más prevalente *C. albicans*. Comúnmente se presenta en forma de levaduras, las cuales consisten en células individuales de apariencia redonda u ovoide, con un diámetro de 2-5 μm , y que se multiplican de manera asexual mediante gemación holoblástica ². En cuanto a la morfología macroscópica las levaduras dan lugar a colonias lisas, redondas, con elevación en forma de cúpula, de color blanco a crema ³. *C. albicans* tiene la capacidad de alterar su morfología (pleomorfismo) como respuesta a cambios microambientales para presentarse en forma de pseudohifas o hifas verdaderas. Las pseudohifas presentan una morfología filamentosa alargada, y están compuestas de células elípticas con el centro más ancho que los extremos, con constricciones en las uniones septales, y unidas de extremo a extremo ⁴. En cambio, las hifas son uniformes en ancho con extremos paralelos, y poseen tabiques verdaderos que carecen de constricciones, los cuales se forman dentro del tubo germinal ⁵⁻⁶.

C. albicans es un organismo comensal común que puede ser detectado como parte de la microbiota en el 50-75% de la población mundial ⁷⁻⁸. En el humano habita en diferentes zonas del cuerpo sin causar daño incluyendo piel, cavidad

orofaríngea, tracto gastrointestinal y genitourinario, sin embargo, es capaz de comportarse como patógeno ocasionando una infección oportunista cuando se presenta disbiosis, ruptura de las barreras mecánicas y/o defectos en la inmunidad del huésped, aunado a ello la gran variedad de factores de virulencia del hongo ⁹.

La patogenicidad de *C. albicans* involucra la expresión de diferentes adhesinas que se unen a ligandos de la superficie celular o matriz extracelular, y ya sea en respuesta a ello o a señales ambientales, las levaduras pueden filamentar para continuar con los procesos de invasión a los tejidos ya sea por endocitosis inducida, penetración activa o ambas ¹⁰⁻¹². Durante el proceso de penetración se expresan una serie de enzimas hidrolíticas tales como aspartil proteasas secretadas (Sap), lipasas (LIP) y fosfolipasas (PL), las cuales participan en el daño a la membrana celular, degradación de tejidos y escisión de proteínas de la defensa inmunitaria del huésped ^{9,13-14}. Un factor de virulencia recientemente descrito es la toxina peptídica candidalisina, la cual es secretada exclusivamente por hifas de *C. albicans* y es fundamental durante infecciones mucocutáneas y sistémicas (Moyes 2016), induciendo la formación de poros en las membranas de células epiteliales y provocando lisis celular ¹⁵⁻¹⁷.

1.2. Candidosis

El término candidosis se refiere a cualquier infección ocasionada por microorganismos del género *Candida*, siendo las principales especies causantes

de esta enfermedad *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*, responsables hasta del 90% de los casos, de las cuales solamente *C. albicans* ocasiona alrededor del 50-80%, por lo que sigue siendo la especie más frecuentemente aislada a pesar del aumento en la incidencia de las especies no-*albicans* ^{7,18-19}. Según las manifestaciones clínicas, la candidosis puede ser localizada o invasiva ²⁰⁻²¹.

La candidosis localizada ocurre cuando se ven afectadas la piel (candidosis cutánea) o las mucosas (candidosis mucocutánea) ²¹. En lactantes ocurre una forma especial de candidiasis cutánea conocida como dermatitis del pañal, caracterizada por maceración, erosión y descamación debido al entorno húmedo y cálido ²²⁻²³. La candidosis gastrointestinal se presenta con dolor abdominal, inflamación y diarrea, además está asociada a lesiones ulcerativas y perforativas, representando una importante vía para la invasión al torrente sanguíneo ²⁴⁻²⁵. La candidosis vaginal puede ser asintomática, pruriginosa o dolorosa con aparición de lesiones blancas en forma de placa y una secreción vaginal blanca, además en mujeres embarazadas esta manifestación puede ocasionar infecciones localizadas o sistémicas en el recién nacido durante su paso a través de la vagina afectada ^{24,26}.

La candidosis invasiva puede ser sistémica cuando se presenta como una infección al torrente sanguíneo (candidemia), o puede ser diseminada cuando hay invasión fúngica a múltiples órganos, siendo los más afectados riñones, hígado, bazo, pulmones, corazón y cerebro ²⁸. Se cree que el mecanismo más común que causa la infección del torrente sanguíneo es la translocación a través

de las barreras gastrointestinales después de sufrir daño tisular, aunque también es frecuente la administración de *Candida* vía intravenosa a través de dispositivos médicos como catéteres contaminados con biopelículas ^{24,28-29}. Tanto en adultos como en población pediátrica, las manifestaciones clínicas de la candidosis invasiva son inespecíficas similares a la bacteremia, las cuales van desde fiebre o hipotermia, resfriado y escalofríos hasta intolerancia alimentaria, dificultad para respirar, convulsiones y shock séptico; los síntomas focales como disnea o dolor abdominal pueden estar presentes en casos de diseminación a órganos ^{20,30-31}.

La incidencia de candidosis invasiva está estrechamente relacionada con la edad observándose las máximas tasas en los extremos, siendo los pacientes pediátricos muy jóvenes el grupo de riesgo más afectado ³²⁻³³.

1.3. Candidosis invasiva neonatal

Se ha reportado que los principales microorganismos causantes de infecciones del torrente sanguíneo en pacientes pediátricos hospitalizados son bacterias grampositivas principalmente de los géneros *Staphylococcus* y *Enterococcus*, sin embargo, *C. albicans* se ha posicionado como la tercera causa más frecuente en este grupo de pacientes, y como el principal patógeno fúngico ³⁴. Por su parte, dentro de la población pediátrica son los recién nacidos el grupo más vulnerable a esta micosis representando aproximadamente entre el 30-40% de los casos, especialmente los nacidos a pretérmino quienes presentan la mayor incidencia

de candidemia con casi el 80% de los casos ³⁵⁻³⁹. A pesar del tratamiento con medicamentos antifúngicos, la mortalidad neonatal por candidosis invasiva sigue siendo considerablemente alta con tasas estimadas del 30-62% de defunciones, y tasas aún más altas de daños neurológicos permanente en los neonatos supervivientes como parálisis cerebral, ceguera, deficiencias auditivas y cognitivas y leucomalacia periventricular ³⁹⁻⁴¹.

La meningoencefalitis durante la candidosis en el sistema nervioso central (SNC) del recién nacido suele ser uno de los principales cuadros clínicos, las radiografías y ultrasonidos revelan realce meníngeo, vasculitis y/o focos parenquimatosos de apariencia nodular, los cuales pueden variar desde múltiples lesiones pequeñas hasta una sola masa grande, que histopatológicamente pueden presentarse como granulomas o abscesos ^{20,42}.

Existen factores únicos que predisponen a los recién nacidos a desarrollar candidosis invasiva, tales como: 1) nacimiento prematuro y bajo peso al nacer (los recién nacidos prematuros con un peso al nacer extremadamente bajo tienen 10 veces mayor riesgo de desarrollar candidosis invasiva en comparación con los neonatos a término y adultos ⁴³); 2) procedimientos invasivos en las unidades de cuidados intensivos neonatales (UCIN) tales como uso de catéteres intravenosos o ventilación mecánica ³⁸; 3) alteración de la microbiota debido al uso de antibióticos durante el parto ²⁰; y 4) diferencias funcionales del sistema inmune neonatal en comparación con los adultos ⁴⁴.

1.4. Sistema inmune neonatal

Debido al entorno carente de microorganismos en el que se desarrolla el feto, el sistema inmune del recién nacido tiene preferencia por mecanismos de tolerancia inmunológica los cuales regulaban la interacción materna antes del nacimiento, por lo que presenta importantes limitaciones tanto en la inmunidad innata como adaptativa, y estas limitaciones son aún más marcadas en el recién nacido a pretérmino ⁴⁵⁻⁴⁶.

En cuanto a la inmunidad innata se sabe que la capacidad de presentación de antígenos de las células dendríticas (DC), monocitos y macrófagos se ve afectada debido a la baja expresión de MHCII, por su parte los monocitos y macrófagos presentan una disminución en las moléculas de adhesión conduciendo a una menor infiltración en los tejidos dañados, además se ha demostrado que estas células tienen una disminución general de las respuestas de citocinas en comparación con las células adultas ⁴⁷⁻⁴⁸; en los neutrófilos neonatales se encuentran limitadas las capacidades de rodadura y adhesión, movimiento quimiotáctico, fagocitosis, generación de radicales de oxígeno, muerte intracelular de patógenos y netosis ⁴⁹⁻⁵¹; las células asesinas naturales (NK) muestran una disminución de la capacidad de degranulación que da como resultado una citotoxicidad ineficiente ⁵². En el neonato a pretérmino se presentan otras deficiencias en las respuestas no celulares tal como la reducida producción de proteínas solubles (péptidos antimicrobianos, IgG, y proteínas del complemento) que afectan la destrucción de patógenos, la opsonización y la actividad de los fagocitaria ⁴⁶. Por último, las barreras cutánea, mucosa e

intestinal son más vulnerables al ataque por patógenos en los recién nacidos a pretérmino que en los nacidos a término ⁵³.

La inmunidad adaptativa involucra la participación de linfocitos T y B, sin embargo, en recién nacidos estas poblaciones son considerablemente menores que en adultos ⁵⁴. De hecho, las células T presentan una respuesta deficiente debido a la mayor proporción de linfocitos T vírgenes como resultado de la baja expresión de MHCII por parte de las células presentadoras de antígeno profesionales ⁵⁵. Los linfocitos T que logran ser activados tienen preferencia por inducir una respuesta tipo humoral (Th2) o reguladora (Treg), que se caracterizan por la secreción de un perfil antiinflamatorio de citocinas, lo que hace que el recién nacido sea un objetivo para ser infectado por microorganismos que requieren una respuesta inmune mediada por células ^{46,56}. La reducida expresión del ligando CD40 (CD40L) en los linfocitos T y de CD40 en los linfocitos B impacta en la inmunidad humoral afectando la capacidad de los linfocitos B vírgenes para cambiar de isotipo en la activación, y reduciendo la producción de anticuerpos IgG e IgA las células plasmáticas ⁴⁶.

En gran medida, las diferencias funcionales del sistema inmune neonatal comparado con el adulto explican la alta vulnerabilidad de los recién nacidos a contraer graves infecciones del torrente sanguíneo con invasión a órganos como sucede con la candidosis diseminada ^{50,45}. El conocimiento que actualmente se dispone acerca del sistema inmune neonatal y de la patogénesis durante enfermedades infecciosas como las ocasionadas por bacterias, virus y hongos, se ha obtenido en parte por estudios que emplean modelos animales neonatales

que intentan emular las condiciones en el recién nacido humano. Sin embargo, hoy en día la información relacionada con la interacción huésped-*Candida* durante el período neonatal es limitada, por lo que los modelos experimentales de candidosis neonatal que emulen lo más posible la condición prematura son necesarios para obtener una comprensión más profunda de esta compleja relación.

1.5. Modelo de candidosis diseminada neonatal murina

Anteriormente nuestro equipo de trabajo estableció un modelo utilizando ratones recién nacidos con el fin de emular la condición del recién nacido prematuro humano ⁵⁷⁻⁵⁸. Se inocularon por vía intravenosa (i.v.) a través de la vena yugular externa grupos experimentales de ratones recién nacidos menores de 24 horas de edad con cantidades de 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 y 5×10^6 levaduras de *C. albicans*, así como ratones adultos vía i.v. con concentraciones similares y mayores. Los resultados mostraron que la muerte de los ratones recién nacidos dependía de la cantidad de levaduras, además de que la mortalidad de los ratones recién nacidos ocurrió a tiempos más tempranos post-infección en comparación con los animales adultos. Interesantemente al administrar la cantidad de 1×10^5 levaduras en ratones neonatos la cual corresponde al peso del animal, no se presentó muerte durante el ensayo por lo que se le llamó “inóculo no letal”, mientras que al emplear la cantidad de 5×10^5 la muerte se presentó en casi todos los animales durante la primera semana de infección, razón por la cual se le identificó como “inóculo letal”.

En los ratones adultos el riñón fue el tejido con mayor carga fúngica, mientras que en los neonatos el cerebro junto con el hígado fueron los órganos más afectados mostrando un aumento drástico de la carga durante los primeros 3 días post-infección (d.p.i.), posteriormente a los 4 d.p.i. el cerebro neonatal mostró una disminución de la carga fúngica en los ratones del grupo no letal, en contraste con el aumento constante de la carga en el grupo infectado con el inóculo letal.

El análisis histopatológico del cerebro neonatal reveló la invasión principalmente de filamentos fúngicos acompañada de infiltrado celular con predominio de células polimorfonucleares (PMN) sobre mononucleares (MN), esto desde 1 d.p.i. hasta el final del estudio, demostrando un posible control de la invasión fúngica con moderado infiltrado celular en el grupo infectado con el inóculo no letal, a diferencia del grupo al cual se administró el inóculo letal donde la cantidad de filamentos así como la infiltración fueron mayores.

Al evaluar la expresión y cuantificación del perfil de citocinas se observó que el cerebro de los ratones neonatos infectados con el inóculo no letal mostró una moderada expresión y producción de TNF- α , IL-6 e IFN- γ , lo que posiblemente esté favoreciendo la resistencia a la invasión, en contraste al grupo infectado con el inóculo letal, el cual mostró sobreexpresión y sobreproducción de TNF α , IL-6 e IL-10, con ausencia de IFN- γ , posiblemente promoviendo la susceptibilidad a la invasión.

En resumen, este modelo demostró que los ratones menores de 24 horas de edad infectados con un inóculo no letal pudieron controlar la micosis en el cerebro en un microambiente de perfil moderado de citocinas proinflamatorias y células

PMN/MN durante el período de infección, mientras que, al usar un inóculo letal, la muerte neonatal posiblemente ocurrió debido al daño tisular en el cerebro e hígado asociado con la sobreproducción de citocinas proinflamatorias y actividad celular. Sin embargo, a pesar de los hallazgos de este y otros estudios, aún se desconocen los mecanismos de daño cerebral durante la candidosis diseminada en pacientes neonatales, ya que la mayoría de los estudios sobre la candidosis del SNC están enfocados a los modelos adultos, mientras que los escasos estudios disponibles en neonatos han sido realizados en modelos distintos a la candidosis.

1.6. Inmunopatogénesis cerebral durante la candidosis

Los mecanismos por los cuales *C. albicans* invade el cerebro no han sido esclarecidos completamente, la evidencia sugiere que este hongo atraviesa la barrera hematoencefálica (BHE) a través de la ruta transcelular. Un estudio desarrollado por Liu *et al.*⁵⁹ propone que la transcitosis podría involucrar la interacción de Als3 y Ssa1 fúngicas con la proteína de choque térmico gp96 y otro receptor desconocido expresados en células endoteliales cerebrales. Por otro lado, los mecanismos por los cuales *C. albicans* sale de la célula endotelial hacia el cerebro son aún menos conocidos. Navarathna *et al.*⁶⁰ propusieron que la salida pudiera involucrar un proceso lítico que causa la muerte de las células endoteliales, ya que en ratones adultos se observó por medio de resonancia magnética una pérdida de la integridad de la BHE desde 1 d.p.i. asociada estrechamente con la invasión de *C. albicans*. Aunque es un hecho que la BHE

confiere protección física contra patógenos y agentes extraños, la capacidad de *C. albicans* para penetrar el endotelio sugiere que la principal defensa del SNC contra la invasión fúngica es inmunológica y no física.

La microglía es la principal estirpe celular involucrada en la respuesta inmune del SNC, y aunque tiene un origen totalmente distinto al de los leucocitos mieloides, presenta importantes similitudes fenotípicas con los macrófagos y monocitos tales como la expresión en la superficie de la integrina α M (CD11b) y del antígeno común leucocitario (CD45), aunque este último con una menor expresión⁶¹⁻⁶². En su estado inactivo o en reposo, se distribuye de forma homogénea en todo el parénquima cerebral formando largas ramificaciones vigilantes del entorno circundante para la detección de patógenos incluyendo hongos. Tras su activación, la microglía presenta cambios morfológicos y funcionales adquiriendo una forma ameboide con capacidad fagocítica, además de expresar mayor cantidad de MHCII para la presentación de antígenos.

Los modelos experimentales en ratones han mostrado que la glía juega un papel fundamental en la respuesta inmune del SNC contra *C. albicans*, regulando procesos inflamatorios capaces de controlar la invasión. Wu *et al.*⁶³ emplearon un modelo murino de candidemia de bajo grado, en el cual la administración i.v. de 25,000 levaduras de *C. albicans* provocó la formación de estructuras de apariencia granulomatosa compuestas por levaduras rodeadas de células de microglía y astrocitos activadas. Además, en el cerebro de los animales infectados se acumularon péptidos beta amiloides ($A\beta$) físicamente asociados a las levaduras en el centro de las estructuras, lo cual se relacionó con lesiones de

menor tamaño y una mejor eliminación. Sin embargo, es ampliamente reconocido que cualquier respuesta inmune no controlada dentro del SNC desempeña un papel importante en el desarrollo de neuropatologías, tal es el caso de la candidemia de alto grado (>250,000 levaduras) en el trabajo realizado por Lionakis *et al.* ⁶⁴ y que, a diferencia de la infección de bajo grado, es rápida y completamente mortal, presentando invasión profunda y difusa en el cerebro a través de la corteza cerebral y otras regiones anatómicas, acompañada de una liberación masiva de citocinas en el contexto de neutrofilia del SNC.

1.7. Estudios sobre la inmunopatogénesis cerebral en modelos neonatales

De forma general, los estudios sobre los mecanismos de daño cerebral durante infecciones fúngicas neonatales son prácticamente inexistentes, la mayoría del conocimiento sobre la inmunopatogénesis cerebral en neonatos ha sido obtenido por el empleo de otros modelos infecciosos y no infecciosos. Frecuentemente los agonistas de TLRs implicados en el reconocimiento de patógenos se han utilizado para emular infecciones cerebrales en neonatos. Falck *et al.* ⁶⁵ estudiaron los efectos en el cerebro del LPS y PAM (agonistas de TLR-4 y TLR-2 respectivamente), esto cuando se administran vía i.p. en ratas de 7 días de edad. Después de 24 horas ambos grupos presentaban niveles similares de activación de la microglía, sin embargo, únicamente el grupo tratado con LPS presentó muerte celular por apoptosis, así como una elevada expresión de IL-6, TNF- α e IL-1 β , a diferencia del grupo tratado con PAM que adicionalmente expresó altos niveles de IL-10. Los autores sugieren que el mecanismo de la

apoptosis inducida por inflamación no se limita simplemente a la activación de la microglía, sino que podría intervenir el fenotipo microglial u otros eventos inmunológicos relacionados a la señalización de los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs).

Hasta el momento, el modelo de daño cerebral neonatal mejor descrito es la encefalopatía por HI. Se sabe con anterioridad que tanto agonistas de TLRs así como la HI en modelos murinos resultan individualmente en daño a la materia gris y blanca, además de que estas lesiones son agravadas tras el insulto con HI combinado con LPS ⁶⁶⁻⁶⁹. Wang *et al.* ⁷⁰ investigaron el efecto de una dosis baja de LPS (0.05 mg/Kg) seguido de una leve exposición a HI (30 minutos) en ratas de 2 días de edad. Las agresiones con LPS o HI por sí solas no resultaron en daño cerebral considerable, en cambio, el grupo tratado con LPS e HI mostró lesiones significativas en la materia blanca con disminución de la proteína de mielina básica, así como muerte apoptótica de los progenitores de oligodendrocitos. Este daño se asoció a un aumento de la microglía activada, elevada expresión de TNF- α y permeabilidad de la BHE. Otros estudios en modelos de alta exposición a HI han mostrado estallido de citocinas acompañado de infiltración de neutrófilos y monocitos en el tejido cerebral a partir de las 4 horas después de la lesión isquémica ⁷¹.

Debido a que el reconocimiento de un patógeno involucra la participación de múltiples PRRs, así como la comunicación entrecruzada de sus vías de señalización para responder ante la infección, el uso de agonistas de TLRs no siempre replica los eventos patológicos de las enfermedades ocasionadas por

microorganismos. Lai *et al.* ⁷² utilizaron un modelo de ratones de 4 días de edad para investigar la lesión cerebral por *Staphylococcus epidermidis*, así como en combinación con HI. La inoculación i.p. produjo bacteriemia y sepsis con un incremento de citocinas proinflamatorias en la sangre a las 2 y 14 h.p.i., mientras que el cerebro también presentó una elevación transitoria de quimiocinas atrayentes de neutrófilos y monocitos (CXCL1, CCL2 y G-CSF) a las 14 y 24 h.p.i., acompañada de mayor actividad de caspasa-3 como señal de muerte por apoptosis. La BHE sufrió un aumento de la permeabilidad junto con una disminución del flujo sanguíneo a las 14 h.p.i., lo que posiblemente contribuyó a la vulnerabilidad del cerebro. Cuando se indujo HI después de la infección, se observó daño cerebral más severo tanto en la materia gris como en la materia blanca a los 10 d.p.i., lo que disminuyó considerablemente en los animales tratados con el antibiótico vancomicina.

La capacidad de reflejar los eventos inmunopatológicos murinos neonatales a los recién nacidos humanos se ve afectada por las diferencias en los mecanismos de defensa contra patógenos entre ambas especies. El estudio de los efectos por HI en neonatos humanos a menudo se ve limitado por cuestiones éticas, sin embargo, los procedimientos quirúrgicos cardíacos neonatales que inducen isquemia cerebral ofrecen la oportunidad de evaluar estos mecanismos. Un estudio prospectivo realizado por Algra *et al.* ⁷³ en recién nacidos sometidos a reconstrucción de arco aórtico, lo cual conlleva aproximadamente 30 minutos de HI, mostró un aumento a las 24 horas del número de neutrófilos y monocitos en la sangre venosa cerebral en comparación con la sangre arterial, asimismo los

neutrófilos incrementaron la expresión de CD11b como señal de activación, mientras que la activación de monocitos se evidenció por la expresión de CD16, adicionalmente estos eventos se vieron acompañados por un incremento de IL-6 en la sangre venosa proveniente del cerebro presuntamente por el efecto de la activación celular.

En conjunto, los estudios de HI en animales y recién nacidos muestran un mecanismo de respuesta inflamatoria temprana en el cerebro que desempeña un importante papel en la muerte neuronal (Figura 1). La encefalopatía por HI neonatal se caracteriza por una muerte neuronal necrótica extensa, donde las señales de peligro derivadas de las neuronas muertas tales como incluyendo HMGB1, ATP y otros patrones moleculares asociados al daño (DAMPs), son reconocidas por la microglía y astrocitos a través de PRRs y otros receptores, lo que induce la activación de estas células. La activación celular tiene un papel neurotóxico directo en promover la apoptosis neuronal al liberar una gran cantidad de citocinas proinflamatorias, NO y ROS. Además, la producción de TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-12, quimiocinas y MMP por la glía activada, junto con DAMPs neuronales, aumentan la permeabilidad de la BHE, contribuyendo al reclutamiento de células inflamatorias periféricas en el cerebro lesionado, lo que conlleva una exacerbación de la neuroinflamación y posterior muerte neuronal ⁷⁴.

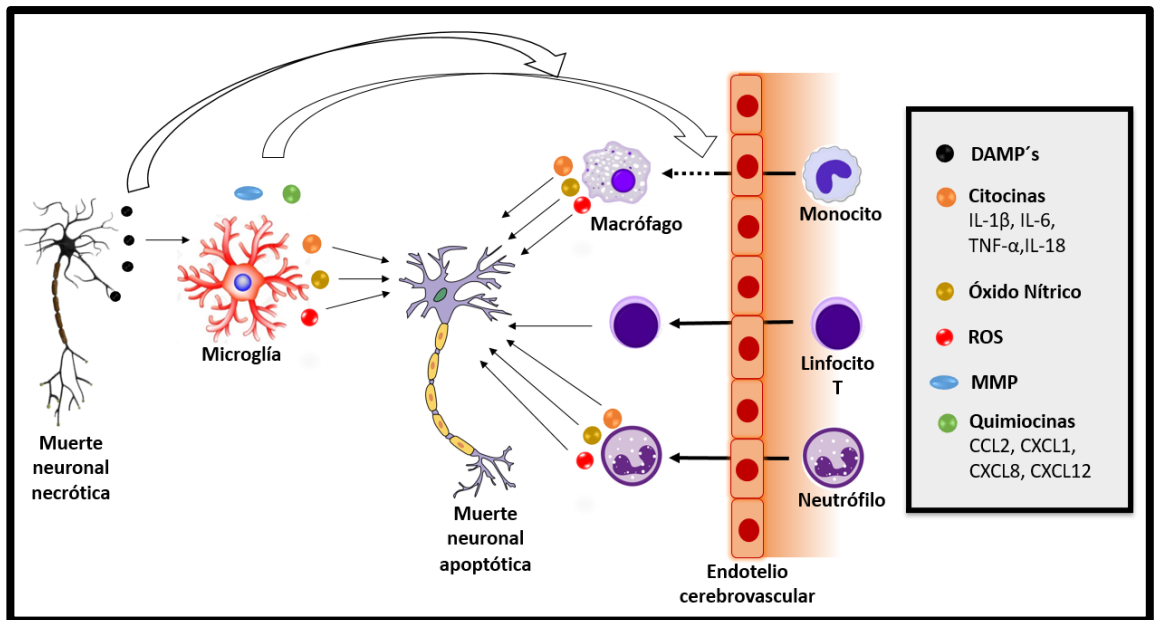


Figura 1. Mecanismo de daño cerebral causado por hipoxia-isquemia en recién nacidos. Adaptado de Li B., *et al.* ⁷⁴.

Estos modelos nos llevan a preguntarnos cuales son los procesos de inmunopatogénesis temprana durante la candidosis murina en el cerebro. Los distintos modelos infecciosos como hipóxicos revisados, tanto en animales neonatos como adultos, apuntan a la participación del agente causal, así como de células infiltrantes y residentes del cerebro, en los procesos iniciales de inmunopatogénesis de este órgano, sin embargo, esto no ha sido demostrado en un modelo de candidosis diseminada neonatal.

2. JUSTIFICACIÓN

La candidosis diseminada afecta tanto a personas inmunosuprimidas como a la población pediátrica, sin embargo, son los recién nacidos principalmente a pretérmino el grupo de riesgo más importante. Dentro de las infecciones fúngicas del torrente sanguíneo más frecuentes, la candidosis diseminada ocupa el primer lugar presentando una elevada mortalidad alrededor del 50-60%.

Aunque la diseminación puede ocurrir a distintos órganos simultáneamente, uno de los principales sitios de infección en recién nacidos humanos es el cerebro, donde los casos clínicos han evidenciado importante daño neurológico. De hecho, es común en aquellos neonatos que logan sobrevivir la presencia secuelas neurológicas que abarcan trastornos cognitivos, ceguera o parálisis cerebral.

Los estudios sobre la inmunopatogénesis de la candidosis invasiva en este órgano están principalmente enfocados a modelos adultos, sin embargo, son prácticamente nulos en modelos neonatales, por lo consideramos la importancia de comenzar con la caracterización de los procesos tempranos de esta enfermedad, a fin de aportar conocimiento que sea útil para relacionarlo con fenómenos inflamatorios posteriores, y que pueda contribuir a explorar nuevas estrategias de diagnóstico y tratamiento.

3. HIPÓTESIS

La invasión de *Candida albicans* en el cerebro de ratones recién nacidos ocasiona muerte celular por necrosis y/o apoptosis, desencadenando cambios fisiológicos que inducen la activación de la microglía.

4. OBJETIVOS

Objetivo General

Describir los mecanismos de daño que promueven el proceso inflamatorio en el cerebro durante la candidosis murina neonatal temprana.

Objetivos específicos

1. Analizar el efecto de la candidosis invasiva en el peso de ratones recién nacidos durante una cinética de infección.
2. Evidenciar la presencia de *C. albicans* e infiltrado celular en las regiones anatómicas del cerebro neonatal durante la cinética de infección.
3. Determinar la activación de la microglía en ratones recién nacidos como respuesta a la invasión fúngica en el cerebro.
4. Demostrar el tipo de muerte que podría estar ocurriendo en el cerebro de ratones recién nacidos con candidosis invasiva neonatal.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Animales de experimentación

El protocolo experimental del presente proyecto fue aprobado con el número de registro MB21-00001, por parte del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL), así como por el Comité de Investigación y Ética de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Los animales se alojaron en el bioterio del Laboratorio de Microbiología Experimental (LME) del Departamento de Microbiología, el cual cuenta con autorización de SENASICA/SADER para actividades de experimentación e investigación científica con la clave AUT-B-B-1216-029, apegándose a la NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio”. El LME cuenta con normas adicionales establecidas en el “Manual de Procedimientos y Bioseguridad del Laboratorio de Microbiología experimental” (LME-MPSBS-997-MAN, edición E, año 2020) y en el “Procedimiento Normalizado de Operación para el Manejo de Animales de Experimentación del Laboratorio de Microbiología Experimental” (LME-PMA-997-PNO, edición A, año 2016).

Para la realización de este trabajo se utilizaron ratones de la cepa BALB/c de menos de 24 horas de edad, los cuales se obtuvieron a partir de la cruce de ratones adultos de pie de cría. Los animales se alojaron en el bioterio del Laboratorio de Microbiología Experimental (LME) del Departamento de Microbiología, a condiciones controladas de temperatura (18-26 °C) y humedad

(40-70%), así como en un ambiente libre de patógenos provisto por un equipo de alojamiento LAB & Bio (ProBlo-Tech). Los animales neonatos fueron amamantados por sus madres o nodrizas, mientras que los adultos para pie de cría fueron alimentados bajo condiciones estándares y con libre acceso (*ad libitum*).

5.2. Lote de trabajo de *C. albicans* y activación de la cepa

Para preparar el lote de trabajo de *C. albicans* se utilizó una cepa de referencia (lote semilla) ATCC® con el número de catálogo 66027™, la cual se encuentra almacenada a -70 °C en crioviales que contienen medio líquido Sabouraud con 30% de glicerol estéril, y resguardada en el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosa (CRCEI) del Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, UANL.

Se descongeló un criovial del lote semilla en baño María a 37 °C durante 5 minutos y agitación constante, después de lo cual el contenido se transfirió a un tubo cónico de 50 ml, se agregaron 15 ml de SSF (NaCl 0.9% p/v) y se centrifugó el tubo a 1,500 r.p.m. durante 10 minutos, posteriormente se decantó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en 2 ml de SSF. Se inocularon 10 placas de agar dextrosa Sabouraud (pH 5.6 ± 0.2) con 50 µl de la suspensión de levaduras y se incubaron a 30 °C. Después de 48 horas se removió la biomasa de las placas con la ayuda de un hisopo estéril y se realizaron 3 lavados colocando las levaduras en un tubo cónico con 15 ml de SSF, centrifugando la

suspensión durante 10 minutos a 1,500 r.p.m. y decantando el sobrenadante. Después de los lavados se resuspendieron las células en 5 ml de SSF, se prepararon diluciones seriadas 1:10, y de la última dilución se tomaron 10 µl los cuales se mezclaron con 10 µl de azul tripán 0.4% para posteriormente realizar el conteo de levaduras viables (no teñidas) en una cámara de Neubauer. Por último, se tomaron 1×10^6 levaduras transfiriéndolas a crioviales y se ajustó el volumen final a 1 ml con medio líquido Sabouraud-30% de glicerol, almacenando los crioviales obtenidos (lote de trabajo) a -70 °C hasta su uso.

Para la activación de la cepa se descongeló un criovial del lote de trabajo como se describió anteriormente, se tomaron 50 µl de la suspensión y se sembraron en agar dextrosa Sabouraud incubando a 30 °C, realizando los pases del hongo a una nueva placa cada 48 h. Para los experimentos se utilizaron solo cultivos entre los pases 4 al 10, después de lo cual se descongeló un nuevo criovial.

5.3. Preparación de los inóculos

Co la ayuda de un aplicador de madera estéril se recolectó la biomasa a partir de cultivos entre 24 y 48 horas y se realizaron dos lavados resuspendiendo las levaduras en un tubo cónico con 15 ml de SSF, centrifugando la suspensión a 1,500 r.p.m. durante 10 minutos y decantando el sobrenadante. Después se homogenizó el paquete celular con 5 ml de SSF, se prepararon diluciones seriadas 1:10, y se realizó por duplicado la cuenta y viabilidad celular con azul tripán en una cámara de Neubauer. Finalmente se efectuaron los cálculos

necesarios para preparar los inóculos de 1×10^5 (no letal) y 5×10^5 (letal) levaduras/30 μ l en SSF estéril.

Cada vez que se prepararon inóculos se comprobaron las concentraciones de estos mediante cuenta en placa tal como se describe en el ensayo de carga fúngica.

5.4. Infección sistémica en ratones recién nacidos

Según el modelo de infección y la técnica de administración intravenosa informada por Kienstra *et al.* ⁷⁵, se infectaron ratones de la cepa BALB/c menores de 24 horas de edad con 1×10^5 (inóculo no letal) o 5×10^5 (inóculo letal) levaduras de *C. albicans* contenidas en 30 μ l de SSF estéril a través de la vena yugular externa. Además, se utilizó un grupo control (grupo vehículo) de ratones recién nacidos inyectados con SSF estéril libre de pirógenos.

5.5. Cinética de peso

Para evidenciar el efecto del peso en ratones recién nacidos con candidosis invasiva, los animales fueron pesados a los tiempos de 0, 6, 24, 48 y 72 h.p.i., utilizando una balanza granataría digital Ohaus™ la cual cuenta con una precisión de 0.001 g.

5.6. Determinación de carga fúngica

Los animales fueron sacrificados a las 1, 3, 6 12, 24 y 48 h.p.i., después de lo cual en condiciones asépticas el cerebro fue extraído y colocado en un microtubo de 1.5 ml, se registró el peso del órgano y a continuación se maceró el órgano en un homogenizador de vidrio con 500 µl de SSF estéril. Después se prepararon diluciones seriadas 1:10 (450 µl de SSF + 50 µl de muestra) y se sembraron por duplicado 50 µl extendiendo el volumen en placas de agar dextrosa Sabouraud, las cuales fueron incubadas a 30 °C durante 48 h. Posteriormente se realizó la cuenta de colonias y con base en el peso del órgano se calcularon las UFC/g de la siguiente manera:

$$\text{UFC/g} = (\bar{x}\text{UFC} \times \text{FD} \times \text{FV}) / \text{g}$$

En donde:

UFC/g = Número de UFC por cada gramo de cerebro

$\bar{x}\text{UFC}$ = Promedio del número de colonias contadas en la muestra y duplicado

FD = Factor de dilución de la muestra sembrada

FV = Factor de del volumen sembrado (500 µl de muestra / 50 µl sembrados)

g = Gramos de cerebro pesados

5.7. Análisis histológico

Los cerebros de los ratones neonatos fueron analizados a los tiempos de 1, 3, 6, 12, 24 y 48 h.p.i., empleando para ello la técnica histológica la cual consistió en las etapas de fijación, deshidratación, aclaramiento, inclusión, obtención de los cortes y tinción.

5.7.1. Fijación

Los cerebros removidos fueron colocados inmediatamente en casetes de inclusión y fijados en solución de formaldehído al 4% en PBS 1X (pH 7.4) durante al menos 48 horas, Transcurrido el tiempo de fijación, con una navaja para microtomo se realizó un corte en el plano sagital del cerebro manteniendo siempre ambos hemisferios en el mismo casete y posteriormente se continuó con la técnica histológica.

5.7.2. Deshidratación

Los órganos fijados fueron deshidratados pasando por 2 baños de etanol al 70% durante 12 horas cada uno, posteriormente se transfirieron a 2 baños de etanol al 95% y 2 baños más de etanol al 100% durante una hora por cada uno.

5.7.3. Aclaramiento

El aclaramiento consistió en tratar los órganos durante una hora en una solución de etanol (100%)-xilol 1:1 y posteriormente en 2 baños de xilol por una hora cada uno.

5.7.4. Inclusión

Los órganos fueron sumergidos en 2 baños de parafina líquida (60-65 °C) durante una hora cada uno, después de lo cual ambos hemisferios de un mismo cerebro fueron colocados en un molde de inclusión de acero inoxidable el cual previamente contenía parafina líquida, sobre este molde los hemisferios fueron orientados con el fin de obtener secciones sagitales y parasagitales, después se agregó parafina líquida y se colocó el molde sobre una placa de enfriamiento. Una vez solidificada la parafina se retiraron los moldes y se almacenaron los bloques de parafina en refrigeración a 4-6 °C hasta el momento de obtener los cortes.

5.7.5. Cortes histológicos

A partir de los bloques de parafina se obtuvieron cortes de 10 µm de grosor en el microtomo ajustando el ángulo de inclinación de la navaja a 5°. Las secciones obtenidas fueron colocadas en un baño de flotación con agua destilada y grenetina a una temperatura de 45-50 °C, posteriormente se recuperaron las secciones en la superficie de un portaobjetos. Por cada bloque se prepararon 6

laminillas con 5 secciones cada una, las cuales se repartieron equitativamente para ser procesadas mediante las tinciones de PAS y H&E.

5.7.6. Desparafinación

Previo a las tinciones, las laminillas obtenidas fueron desparafinadas y rehidratadas bajo el siguiente procedimiento:

- Xilol, 10 minutos.
- Xilol, 10 minutos.
- Etanol 100%, 10 minutos.
- Etanol 100%, 10 minutos.
- Etanol 95%, 10 minutos.
- Etanol 95%, 10 minutos.
- Etanol 70%, 10 minutos.
- Etanol 70%, 10 minutos.
- Agua destilada, 10 minutos.

5.7.7. Tinción con ácido peryódico de Shift (PAS)

La tinción PAS, la cual que consistió en las etapas de tinción y deshidratación, fue procesada de acuerdo con lo siguiente:

- Ácido peryódico, 5 minutos.
- Agua común, 30 segundos.

- Agua destilada, 3 minutos.
- Reactivo de Shift, 8 minutos
- Agua común, 30 segundos.
- Agua destilada, 3 minutos.
- Hematoxilina, 1 minuto.
- Etanol 70%, 10 minutos.
- Etanol 95%, 10 minutos.
- Etanol 100%, 10 minutos.
- Xilol, 10 minutos.
- Xilol, 10 minutos.
- Montaje.

5.7.8. Tinción con Hematoxilina y Eosina (H&E)

La tinción H&E se llevó a cabo en dos etapas (tinción y deshidratación) de la siguiente manera:

- Hematoxilina, 5 minutos
- Agua común, 30 segundos.
- Agua destilada, 5 minutos.
- Eosina alcohólica 1%, 30 segundos.
- Agua destilada, 30 segundos.
- Etanol 70%, 20 segundos.
- Etanol 95%, 1 minuto.

- Etanol 100%, 1 minuto.
- Xilol, 10 minutos.
- Xilol, 10 minutos.
- Montaje.

5.7.9. Montaje y microscopía

Las laminillas fueron montadas agregando al portaobjetos 1-2 gotas de resina sintética diluida con xilol, después se colocó cuidadosamente un cubreobjetos evitando la formación de burbujas. Finalmente se examinaron las secciones sagitales bajo el microscopio de campo claro explorando las diferentes regiones y subregiones del cerebro, para lo cual se analizaron 30 secciones por cada grupo experimental con el fin de determinar el grado de invasión e infiltración.

5.8. Análisis por citometría de flujo

5.8.1. Suspensión celular

La suspensión celular del cerebro fue obtenida según el método descrito por Lionakis *et al.* ⁶⁴, en todo momento el proceso se realizó en frío mediante un baño de hielo. Inicialmente el órgano fue extraído y colocado en un microtubo el cual contenía 600 µl de suspensión enzimática (DNAsa de grado I 0.1 mg/ml + Liberace™ TL 0.1 mg/ml + RPMI 1640 sin suero) dentro del cual fue cortado en

trozos pequeños, luego se realizó el proceso de digestión a 37 °C durante 45 minutos con agitación periódica. Transcurrido el tiempo se disgregaron las células aspirando los tejidos a través de una aguja calibre 18G (1.20 mm de diámetro) y después se separaron las células del resto de los componentes tisulares a través de un filtro de 40 µm. Las células fueron centrifugadas a 1,500 r.p.m. durante 10 minutos a 4 °C, y desechado el sobrenadante, se eliminaron los eritrocitos con 1 ml de buffer de cloruro de amonio-potasio (ACK) durante un minuto, después de lo cual se detuvo la lisis agregando 1 ml de PBS 1X, posteriormente se centrifugó la suspensión nuevamente y se eliminó el sobrenadante. Finalmente, el paquete celular fue resuspendido en 100 µl de PBS 1X (análisis de muerte celular) o PBS 1X con 1% de suero (análisis de activación de microglía) y se realizó el conteo y la viabilidad celular con azul tripán en una cámara de Neubauer, utilizando para los posteriores análisis aquellas suspensiones con cuentas mayores a 1.5 millones de células totales y viabilidad superior al 80%.

5.8.2. Activación de la microglía

La microglía se clasificó como una población de expresión alta de CD11b (CD11b^{hi}) y baja de CD45 (CD45^{lo}), mientras que la activación se caracterizó por un aumento en la expresión de MHCII (MHCII⁺)^{61,76-80}. La descripción de los anticuerpos y su preparación se encuentran en la Tabla 1, todos los anticuerpos fueron diluidos en buffer FACS (PBS 1X + suero 1%). Debido a que los anticuerpos CD45, CD11b y MHCII presentaban el mismo isotipo, se prepararon

dos suspensiones de anticuerpos: la suspensión 1 consistió de CD45 purificado, IgG-biotina así como estreptavidina-Alexa Fluor™ 647 (16.7 ng/muestra), los cuales fueron colocados en un mismo microtubo según las cantidades indicadas y preincubados durante 20 minutos a 4° C en oscuridad; la suspensión 2 consistió de CD11b-ficoeritrina (CD11b-PE) y MHCII-PerCP-Cy5.5 preparados en un mismo microtubo justo antes de usarse.

Anticuerpo-conjugado	Origen	Reactividad	Isotipo	ng/muestra
CD45 (purificado)	Rata	Ratón	IgG2b	62.5
IgG-biotina	Cabra	Rata	IgG cabra	62.5
CD11b-PE	Rata	Ratón	IgG2b	6.3
MHCII-PerCP-Cy5.5	Rata	Ratón	IgG2b	8.3

Tabla 1. Anticuerpos utilizados para la clasificación de la microglía.

Por cada muestra se tiñeron 1×10^6 células primeramente con 50 μ l de la suspensión 1 de anticuerpos, después de lo cual se incubaron las células durante 20 minutos a 4°C y oscuridad, posteriormente se realizó un lavado agregando 800 μ l de PBS con 1% de suero y centrifugando las muestras a 1,500 r.p.m. a 4°C. Tras desechar el sobrenadante se agregaron 50 μ l de la suspensión 2 de anticuerpos y de la misma manera se incubaron las células y se realizó un segundo lavado. Finalmente, las células fueron resuspendidas en 200 μ l de PBS 1X y se adquirieron 250,000 eventos en el citómetro de flujo Accuri C6 (BD

Biosciences), mientras que los datos fueron analizados mediante el software FlowJo 10.7.2, LLC.

5.8.3. Muerte celular

Este análisis se realizó mediante la prueba de la anexina V y 7-aminoactinomicina D (7-AAD) de acuerdo con el protocolo del fabricante (BD Pharmingen™). Primeramente, se tomaron 1×10^6 células y se colocaron en un tubo de citometría ajustando el volumen a 1 ml con buffer de unión a anexina V 1X. Luego se transfirieron 1×10^5 células (100 μ l) a otro tubo y posteriormente se agregaron 5 μ l de anexina V-isotiocianato de fluoresceína (anexina V-FITC) más 5 μ l de 7-AAD, después de lo cual se homogenizó la suspensión suavemente en vórtex y se incubó durante 15 minutos en condiciones de temperatura ambiente y oscuridad. Finalmente, fueron añadidos 400 μ l de buffer de unión a anexina V 1X y antes de una hora las muestras fueron adquiridas en el citómetro de flujo analizando 100,000 eventos.

Las células necróticas fueron positivas para 7-AAD; las células en procesos apoptóticos tempranos fueron positivas para la anexina V-FITC; por su parte, las células viables que no sufrieron daño fueron negativas tanto para FITC como para 7-AAD.

5.9. Análisis estadístico

Por cada grupo experimental se manejó una $n=5$, posteriormente los datos obtenidos se analizaron mediante el programa computacional GraphPad Prism 8.0.2 (263). Los valores se muestran como la media \pm desviación estándar, mientras que para el análisis estadístico se realizaron las pruebas de Kruskal-Wallis *post hoc* U de Mann-Whitney para datos no pareados. La significancia fue aceptada para valores de $P<0.05$.

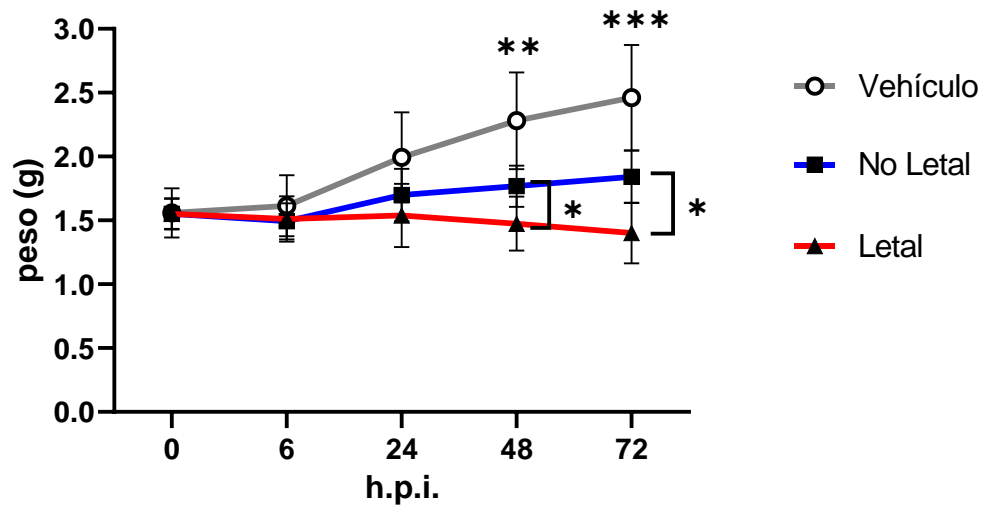
6. RESULTADOS

6.1. Medición del peso de ratones neonatos con candidosis diseminada

Con la finalidad de observar el efecto de la candidosis invasiva en el peso de ratones neonatos, se infectaron animales menores de 24 horas de edad con 1×10^5 (inóculo no letal) y 5×10^5 (inóculo letal) levaduras de *C. albicans*, además de un grupo control al cual se le administro SSF (vehículo), posteriormente se realizó una cinética de infección registrando los pesos de los animales a diferentes tiempos.

Durante las primeras 24 h.p.i. no se detectó variación entre el peso de los animales infectados y sanos, sin embargo, a partir de las 48 h.p.i. se observó que el peso de los ratones infectados fue menor en comparación con el grupo vehículo, y esta diferencia se incrementó a las 72 h.p.i (Figura 2A). Al comparar el peso entre los animales infectados, se encontró que este fue menor cuando se administró un inóculo letal que uno no letal. Estos resultados muestran que durante la candidosis invasiva, el peso de los animales recién nacidos se ve afectado, principalmente cuando se administra una cantidad de levaduras alta, lo que posiblemente sea consecuencia de alteraciones fisiológicas tras la diseminación fúngica a distintos órganos.

A)



B)

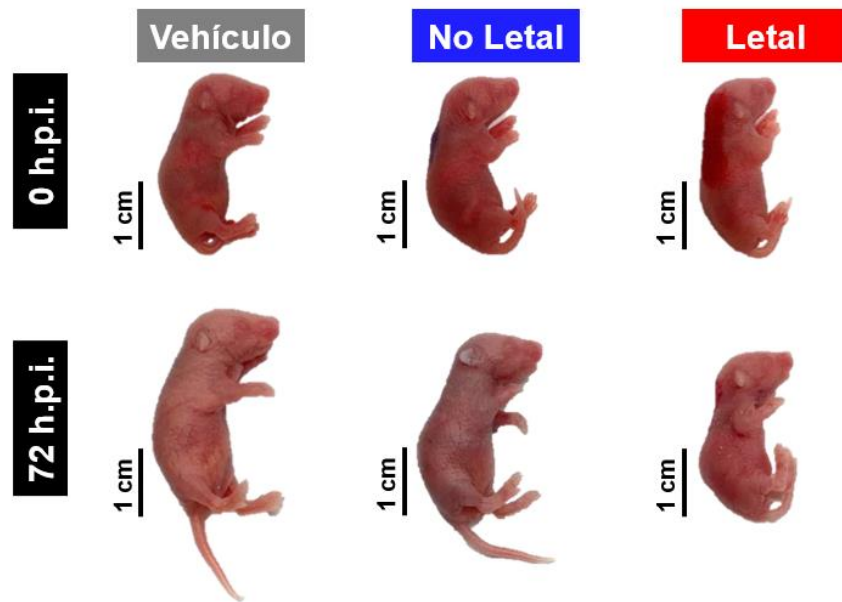


Figura 2. Efecto de la candidosis invasiva en el peso de ratones recién nacidos. Se infectaron animales de menos de 24 horas de vida con 1×10^5 (grupo no letal) y 5×10^5 (grupo letal) levaduras de *C. albicans*, así como SSF (grupo vehículo). A) Cinética de peso durante la candidosis diseminada neonatal murina. B) Imágenes representativas de animales de cada grupo experimental al inicio y final de la cinética. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$. calculada mediante las pruebas de Kruskal-Wallis *post hoc* U de Mann-Whitney (datos no pareados), $n=5$ para cada grupo experimental.

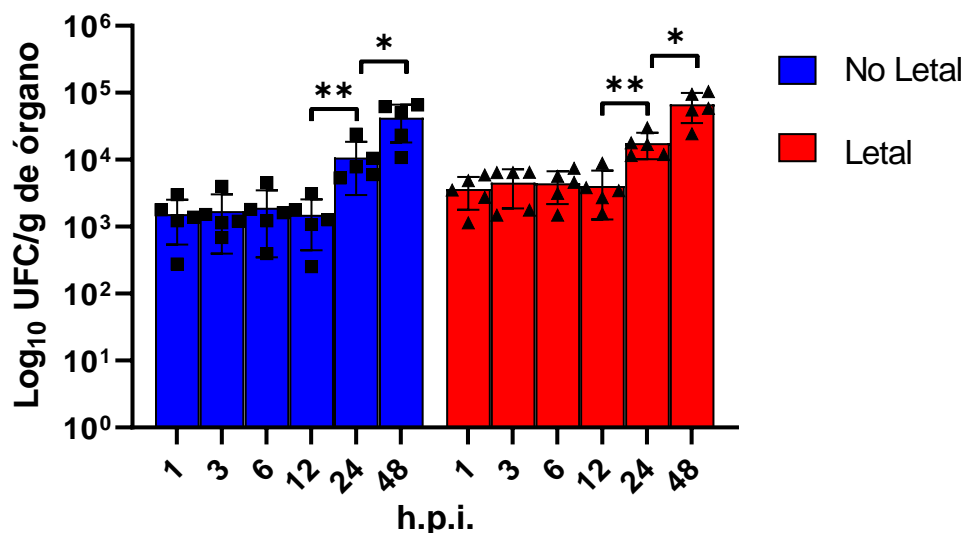
6.2 Invasión de *C. albicans* e infiltración celular en el cerebro de ratones recién nacidos

Previamente se ha vinculado en modelos experimentales adultos y neonatos la pérdida de peso con eventos neurológicos tales como la invasión del agente infeccioso al SNC, así como inflamación tisular. Anteriormente nuestro equipo de trabajo ya había demostrado la presencia de *C. albicans* en el cerebro a las 24 y 48 h.p.i., esto mediante ensayos de cargas fúngicas. Con el objetivo de evidenciar la presencia temprana de *C. albicans* en el cerebro, se determinaron las cargas fúngicas a los tiempos de 1, 3, 6 y 12, 24 y 48 h.p.i. (Figura 3A). Este análisis reveló que, tanto al administrar el inóculo no letal como el letal, hay presencia del hongo en el cerebro desde 1 h.p.i., así también que la carga fúngica se mantuvo constante durante las primeras 12 h.p.i., mientras que a las 24 y 48 h.p.i. se verificó un incremento en la carga similar a lo que anteriormente nuestro equipo de trabajo ya había determinado.

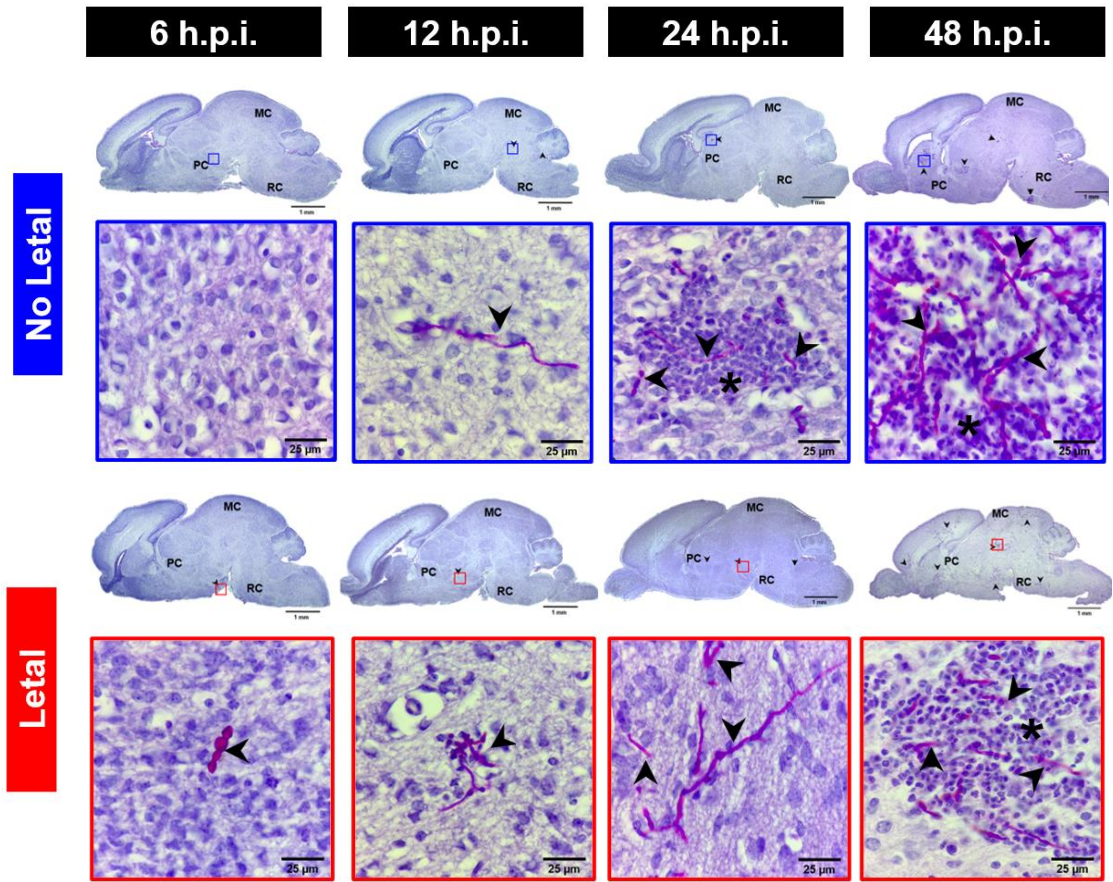
Para esclarecer si además de estar presente en el SNC, *C. albicans* está invadiendo el parénquima cerebral a tiempos tempranos, se examinaron cortes histológicos de secciones sagitales del cerebro de ratones recién nacidos a los tiempos de 6, 12, 24 y 48 h.p.i (Figura 3B). Las secciones fueron procesadas mediante la tinción de PAS para evidenciar estructuras fúngicas, asimismo, se empleó la tinción de H&E con el fin de revelar infiltrado celular. Previamente nuestro equipo de trabajo ya había mostrado la invasión fúngica e infiltración celular a los tiempos de 24 y 72 h.p.i. Nuestros resultados evidenciaron la invasión fúngica predominantemente de levaduras en el parénquima cerebral a

partir de las 6 h.p.i únicamente en el grupo infectado con la concentración letal, mientras que a partir de las 12 h.p.i. se observó la presencia principalmente de pequeños focos de filamentos, esto en ambos grupos experimentales. Por otro lado, no se detectó la presencia de infiltrado celular en ninguno de los grupos experimentales cuando se analizaron estos tiempos. Finalmente, Al analizar los tiempos de 24 y 48 h.p.i. se confirmó la presencia principalmente de filamentos fúngicos (Figura 3B), muchos de los cuales estaban rodeados de infiltrado celular con predominio de PMN sobre MN (Figura 3D), posiblemente formando estructuras de contención aparentemente granulomatosa (Figura 3C). Estos resultados indican que *C. albicans* puede estar presente en el cerebro desde 1 hora después de su ingreso al torrente sanguíneo incluso cuando se administra una concentración baja de levaduras, pero la invasión al parénquima cerebral se puede detectar a tiempos más tempranos cuando se utiliza un inóculo alto.

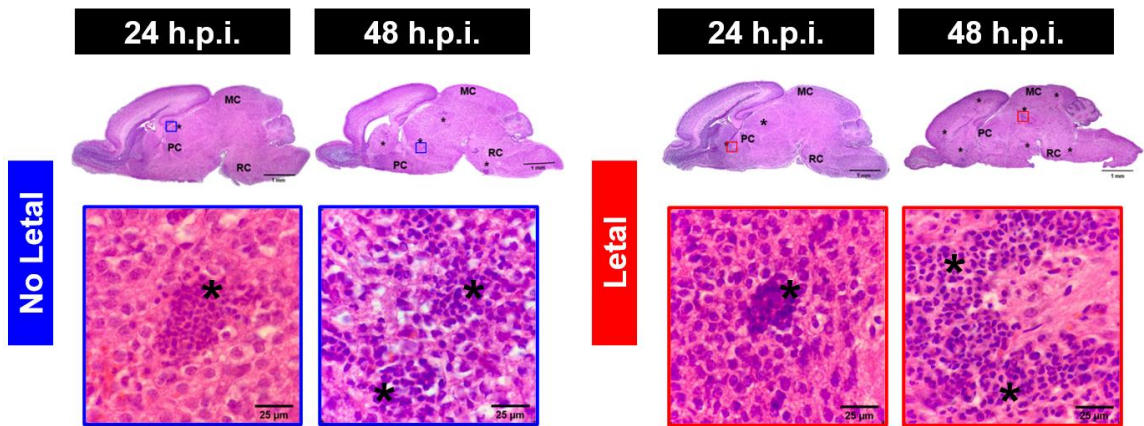
A)



B)



C)



D)

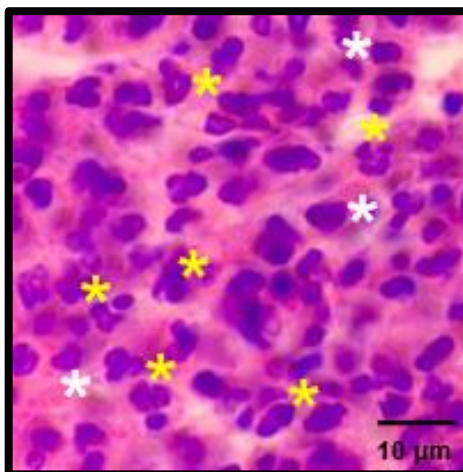


Figura 3. Invasión de *C. albicans* e infiltración celular en el cerebro de ratones neonatos. Animales infectados con 1×10^5 (grupo no letal), 5×10^5 (grupo letal) y SSF (grupo vehículo). A) Determinación de carga fúngica. B) Tinción de PAS y C) tinción de H&E de secciones sagitales del cerebro. D) Predominio de células PMN sobre MN en el parénquima cerebral. Las puntas de flecha negras señalan estructuras fúngicas, los asteriscos negros indican infiltrado celular, los asteriscos amarillos indican infiltrado PMN y los asteriscos negros indican infiltrado MN. PC: prosencéfalo; MC: mesencéfalo; RC: Rombencéfalo. * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$. calculada mediante las pruebas de Kruskal-Wallis *post hoc* U de Mann-Whitney (datos no pareados), $n=5$ para cada grupo experimental.

6.3. Análisis semicuantitativo del grado de invasión fúngica e infiltración celular en diferentes regiones y subregiones anatómicas del cerebro de ratones recién nacidos con candidosis diseminada

Debido a que la invasión fúngica y el infiltrado celular se extendieron a lo largo de las secciones analizadas, se decidió evaluar el grado de invasión e infiltración en las diferentes subregiones anatómicas del cerebro de ratones neonatos con candidosis invasiva neonatal. Una vez identificadas las subregiones (Figura 4), se realizó un análisis semicuantitativo de secciones sagitales.

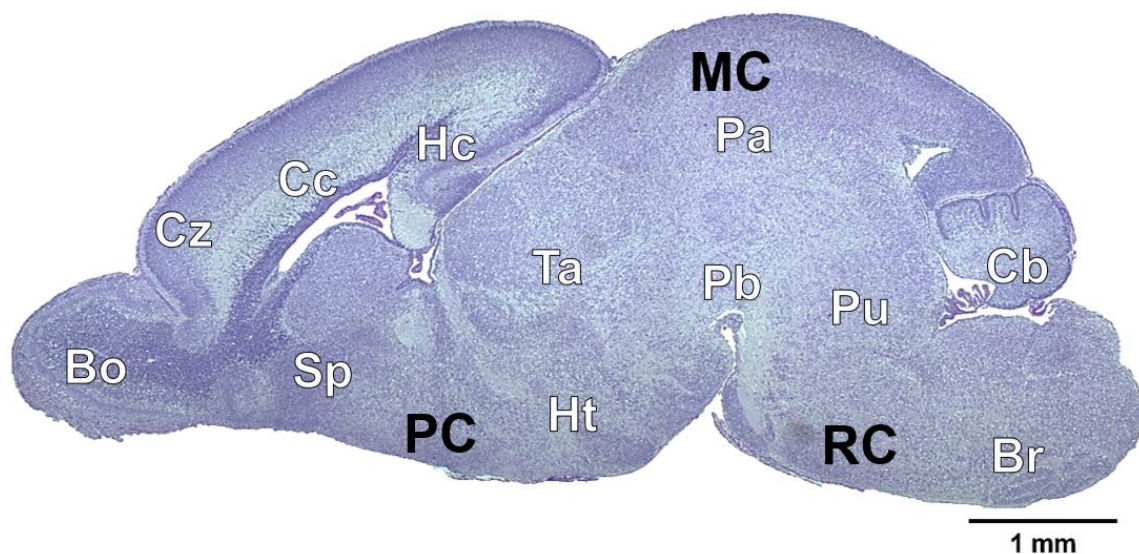


Figura 4. Regiones y subregiones analizadas del cerebro de ratones menores de 24 horas de edad. Imagen representativa de una sección sagital teñida con PAS, correspondiente al cerebro de un animal del grupo vehículo. El prosencéfalo (PC) se dividió en bulbo olfatorio (Bo), corteza cerebral (Cz), cuerpo calloso (Cc), hipocampo (Hc), subpallio central (Sp), tálamo (Ta) e hipotálamo (Ht). Las subregiones estudiadas del mesencéfalo (MC) fueron la placa alar (Pa) y la placa basal (Pb). Por último, las subregiones analizadas del rombencéfalo (RC) fueron el puente de Varolio (Pu), cerebelo (Cb) y bulbo raquídeo (Br).

En cuanto al grado de invasión (Tabla 2), se observó a las 6 h.p.i. que, al administrar un inóculo letal, la mayoría de las subregiones presentaban invasión fúngica de escasa a baja, con excepción del hipocampo, bulbo olfatorio, placa basal y cerebelo, donde no se encontraron estructuras fúngicas. Por su parte, el grupo infectado con el inóculo no letal presentó escasa invasión a las 12 y 24 h.p.i., esto en casi todas las subregiones con excepción del hipocampo. En ambos grupos experimentales se observó una tendencia en el aumento del grado de invasión en las subregiones anatómicas en relación con el tiempo, siendo en todo momento mayor en los animales infectados con el inóculo letal, principalmente a las 48 h.p.i., donde la invasión fue severa en casi todas las

regiones anatómicas del grupo letal. Al final de la cinética, se encontraron diferencias en el grado de invasión del hipocampo, corteza cerebral, bulbo olfatorio, cuerpo caloso, subpalio central, hipotálamo, placa alar, placa basal, puente y cerebelo, mientras que únicamente el tálamo y bulbo raquídeo presentaron similitudes en el grado de invasión siendo severo en ambos casos.

Región				6 h.p.i.		12 h.p.i.		24 h.p.i.		48 h.p.i.	
				No Letal	Letal	No Letal	Letal	No Letal	Letal	No Letal	Letal
Prosencéfalo	Telencéfalo	Palio	Hipocampo	—	—	—	—	—	+	—	++++
			Corteza	—	+	+	+	—	+	++	++++
			Bulbo olfatorio	—	—	—	+	+	+	+	++++
			Cuerpo caloso	—	+	+	—	—	+	++	++++
		Subpalio		—	+	+	+	—	++	+++	++++
	Diencefalo	Tálamo		—	+	+	++	+	+++	++++	++++
		Hipotálamo		—	+	—	++	+	++	+++	++++
	Mesencéfalo	Placa alar		—	+	+	+	+	+++	++++	++++
		Placa basal		—	—	+	+	+	+	+	++++
	Rombencéfalo	Puente		—	+	+	++	+	++	++++	++++
		Cerebelo		—	—	+	—	+	-	+	+++
		Bulbo raquídeo		—	++	+	++	—	++	++++	++++

Tabla 2. Comparación del grado de invasión fúngica en las diferentes subregiones anatómicas del cerebro de ratones recién nacidos con candidosis diseminada. El grado de invasión fue clasificado según el número de secciones teñidas con PAS con presencia de estructuras fúngicas en la respectiva subregión, examinando 30 secciones por cada grupo experimental (n=5). Grado de invasión: — ausente (0 secciones); + escaso (1-5 secciones); ++ bajo (6-10 secciones); +++ moderado (11-15 secciones); ++++ alto (16-20 secciones); +++++ severo (>20 secciones).

Por otro lado, el infiltrado celular no fue detectado sino a partir de las 24 h.p.i. con escasos focos (Tabla 3), en el grupo inoculado con la concentración no letal se encontró únicamente en el tálamo, mientras que en los ratones infectados con el inóculo letal se detectó en el hipocampo, subpalio central, tálamo e hipotálamo. Similar a la invasión, se observaron diferencias en las mismas subregiones, con una tendencia a aumentar con el tiempo de forma considerable, siendo el grado

de infiltración a las 48 h.p.i. de alto a severo en casi todas las subregiones del grupo letal, mientras que en grupo no letal fue de ausente a moderado en la mayoría de las subregiones, con excepción del tálamo, placa alar, puente y bulbo raquídeo, donde la infiltración fue de alta a severa.

Región				24 h.p.i.		48 h.p.i.	
				No Letal	Letal	No Letal	Letal
Telencéfalo	Prosencéfalo	Palio	Hipocampo	—	*	—	***
			Corteza	—	—	**	****
			Bulbo olfatorio	—	—	—	**
			Cuerpo calloso	—	—	**	****
		Subalio		—	*	***	*****
	Diencéfalo	Tálamo		*	*	*****	*****
		Hipotálamo		—	*	***	*****
	Mesencéfalo		Placa alar	—	—	****	*****
			Placa basal	—	—	*	****
	Rombencéfalo		Puente	—	—	****	*****
Cerebelo			—	—	*	**	
Bulbo raquídeo			—	—	*****	*****	

Tabla 3. Comparación del grado infiltración en las diferentes subregiones anatómicas del cerebro de ratones recién nacidos con candidosis diseminada. El grado de infiltración fue clasificado según el número de secciones teñidas con H&E con presencia de infiltrado celular en la respectiva subregión, examinando 30 secciones por cada grupo experimental (n=5). Grado de infiltración: — ausente (0 secciones); * escaso (1-5 secciones); ** bajo (6-10 secciones); *** moderado (11-15 secciones); **** alto (16-20 secciones); ***** severo (>20 secciones).

6.4. Activación de la microglía en el cerebro de ratones con candidosis diseminada neonatal

Ya que anteriormente se ha vinculado la pérdida de peso tanto a la invasión tisular, y a la participación de células infiltrantes así como residentes, realizamos por tanto, un ensayo general de activación de la microglía a las 12, 24, 48 y 72

h.p.i. Se obtuvieron suspensiones celulares a partir del cerebro completo y mediante citometría de flujo se clasificó la microglía activada por poseer un fenotipo $CD11b^{hi}/CD45^{lo}/MHCII^{+}$. Previamente, los debris celulares, dobletes y eventos de autofluorescencia fueron excluidos para posteriormente seleccionar las regiones de interés (Figura 5).

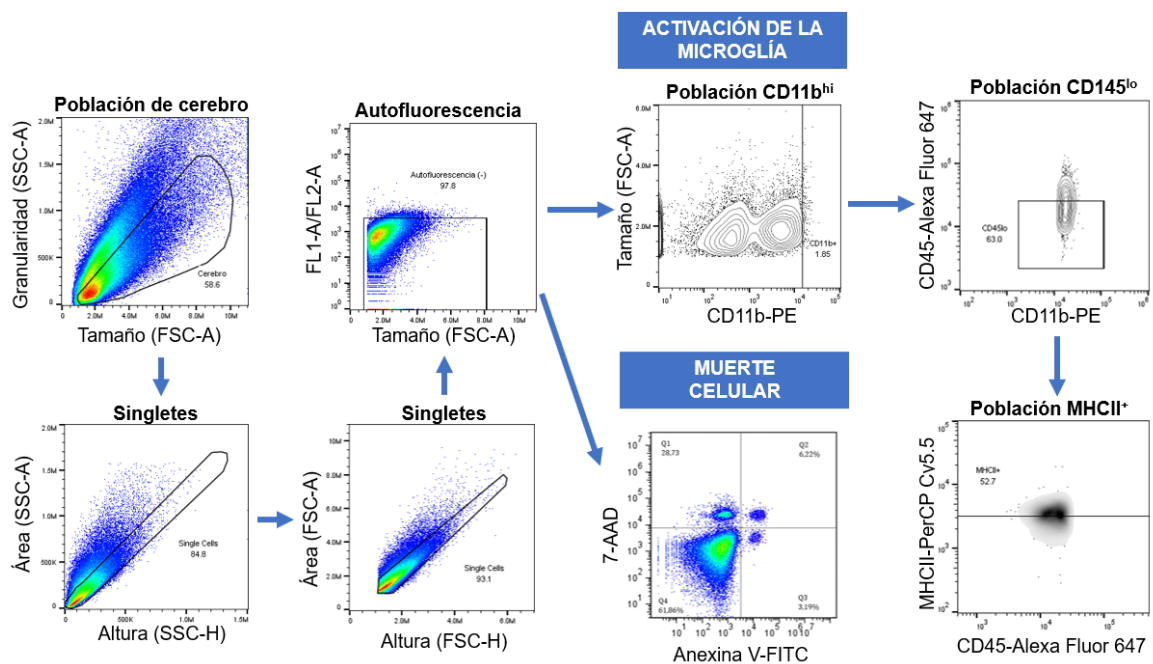
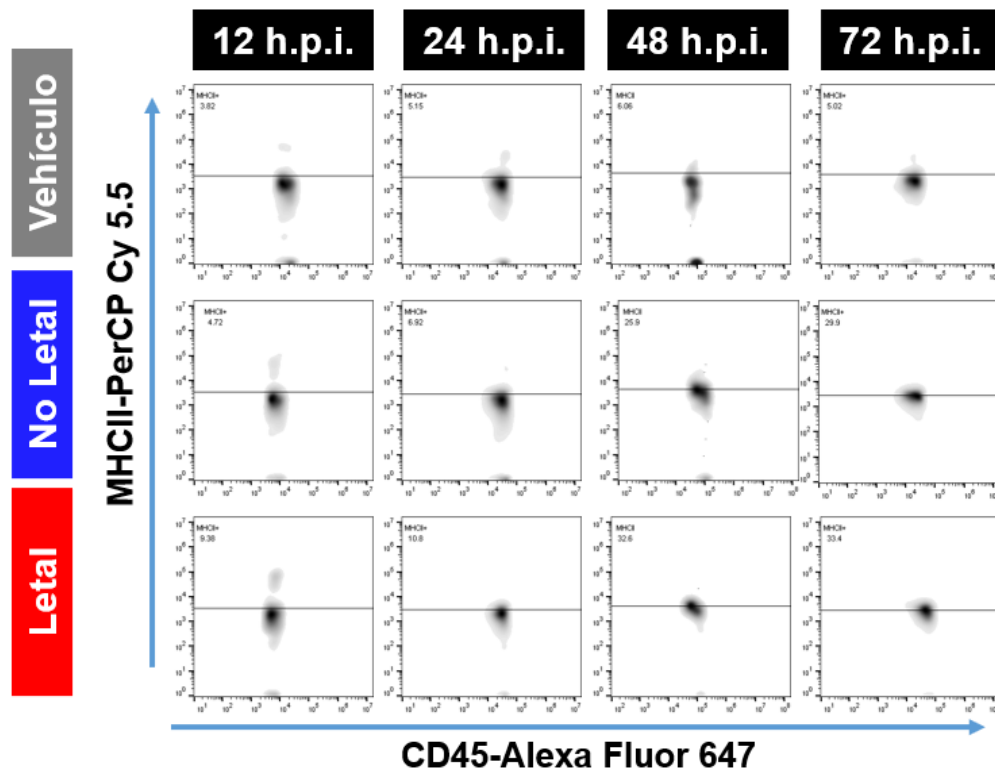


Figura 5. Estrategia para la selección de las poblaciones celulares de interés. Los ensayos de activación de la microglía y muerte celular fueron realizados por separado obteniendo para cada uno diferentes suspensiones celulares de cerebro. Los datos fueron analizados mediante el programa FlowJo 10.7.2, LLC.

Este análisis reveló una leve activación de la microglía a las 12 y 24 h.p.i. únicamente cuando se infectaron ratones con un inóculo letal en comparación con el grupo vehículo, a diferencia de los animales del grupo no letal en los cuales

no se detectó la activación de esta estirpe celular (Figura 6A y 6B). Mientras tanto, el análisis a las 48 y 72 h.p.i. mostró un importante aumento en la activación de la microglía el cual fue similar en ambos grupos de ratones infectados. Estos resultados muestran que cuando se administra un inóculo letal, la microglía es activada a tiempos más tempranos en comparación con la inoculación no letal, lo que posiblemente esté contribuyendo al daño cerebral. Sin embargo, se desconoce si esta activación es una consecuencia directa o indirecta de la infección fúngica.

A)



B)

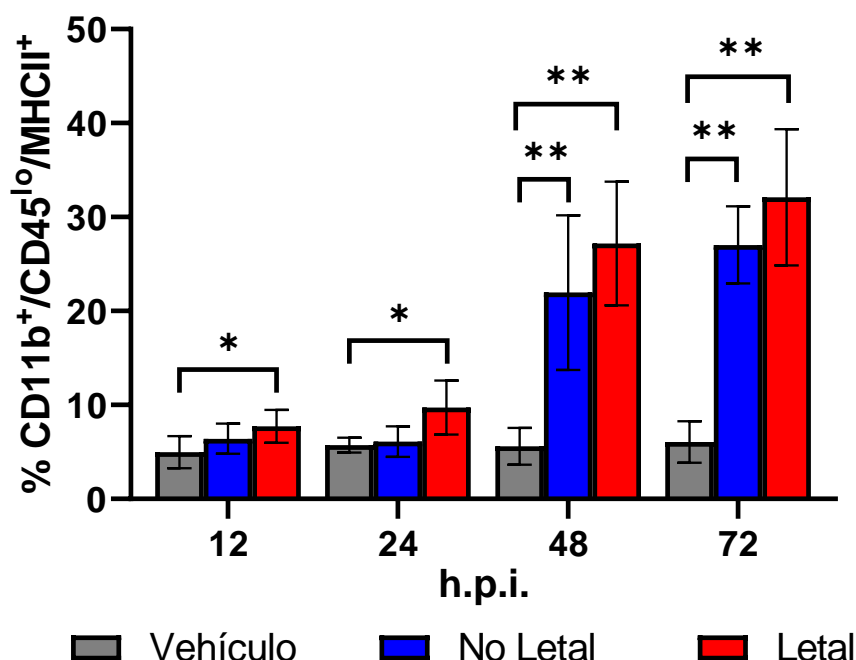


Figura 6. Activación de la microglía durante la candidosis diseminada neonatal. Animales infectados menores de 24 horas de edad con 1×10^5 (grupo no letal) y 5×10^5 (grupo letal) levaduras de *C. albicans*, así como SSF (grupo vehículo). A) Gráficos de densidad (Density Plots) representativos de poblaciones celulares de microglía $CD11b^{hi}/CD45^{lo}$, aquellos eventos $MHCII^+$ se identificaron como microglía activada. B) Cinética de activación de la microglía. * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$, calculada mediante las pruebas de Kruskal-Wallis *post hoc* U de Mann-Whitney (datos no pareados), $n=5$ para cada grupo experimental.

6.5. Muerte celular en el cerebro de ratones neonatos con candidosis diseminada.

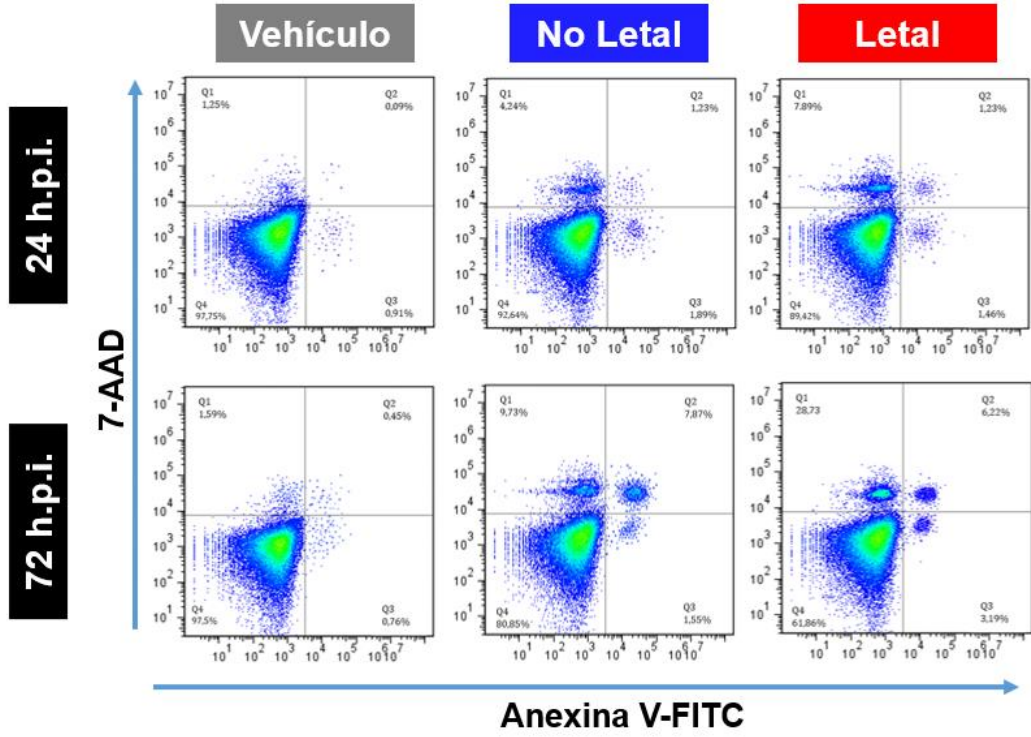
Frecuentemente se ha asociado tanto la invasión de patógenos, así como el infiltrado celular y la actividad de la microglía, en la participación del daño cerebral. Con el objetivo de evidenciar posible muerte celular, se analizó tanto

la necrosis como la apoptosis en el cerebro a las 24 y 48 h.p.i. por citometría de flujo mediante la prueba de Anexina V y 7-AAD. Las células necróticas presentaron tinción con el colorante 7-AAD, mientras que las células apoptóticas fueron positivas para la Anexina; aquellos eventos negativos tanto para 7-AAD como Anexina V fueron clasificados como células viables. Previo al análisis de los datos obtenidos, los debris celulares, dobletes y eventos de autofluorescencia fueron descartados (Figura 5).

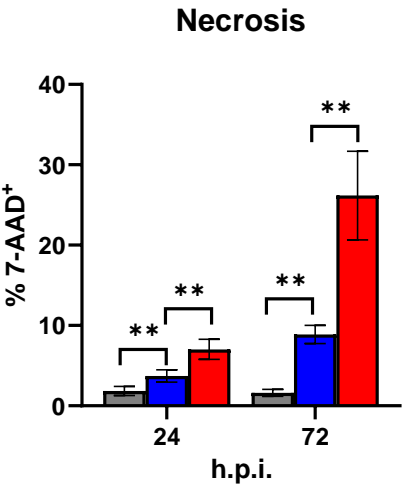
Este análisis evidenció la muerte celular tanto necrótica como apoptótica en el cerebro de ratones recién nacidos infectados con ambos inóculos de *C. albicans*, además, en ambos tipos de muerte se observó un incremento a las 72 h.p.i. (Figura 7A, 7B y 7C). En ambos tiempos la necrosis fue mayor cuando se administró un inóculo letal en comparación del no letal (Figura 7B), mientras que la apoptosis fue similar en ambos grupos infectados (Figura 7C). Al comparar la necrosis contra la apoptosis, se encontró que, al administrar un inóculo no letal, la necrosis fue mayor únicamente a las 24 h.p.i., mientras que a las 72 h.p.i. se observó una tendencia al equilibrio entre ambos tiempos de muerte celular (Figura 7D). En cambio, al administrar un inóculo letal, la necrosis siempre fue mayor que la apoptosis, y esta diferencia se incrementó con el tiempo (Figura 7E). Estos resultados muestran que la invasión de *C. albicans* al cerebro ocasiona muerte celular tanto por necrosis y apoptosis, y que posiblemente la necrosis esté asociada al daño cerebral aportando a la muerte de los animales, mientras que el equilibrio entre necrosis y apoptosis

conlleve al control de la infección en el órgano favoreciendo la supervivencia de los ratones.

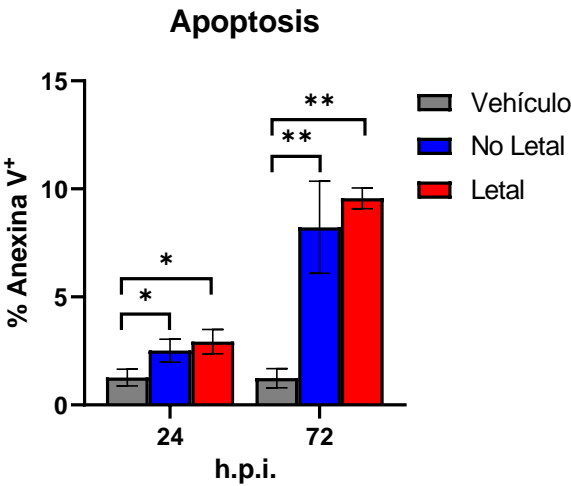
A)



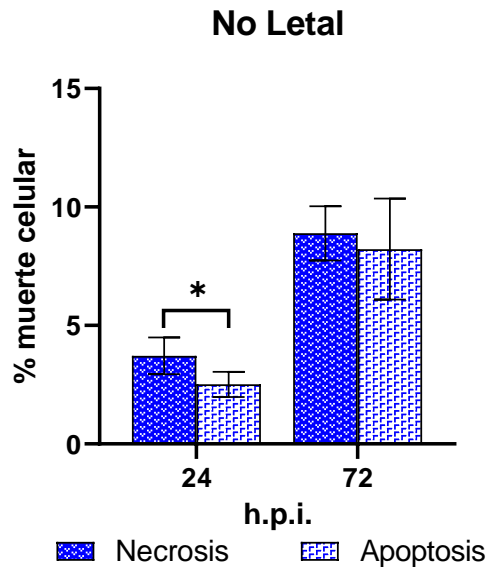
B)



C)



D)



E)

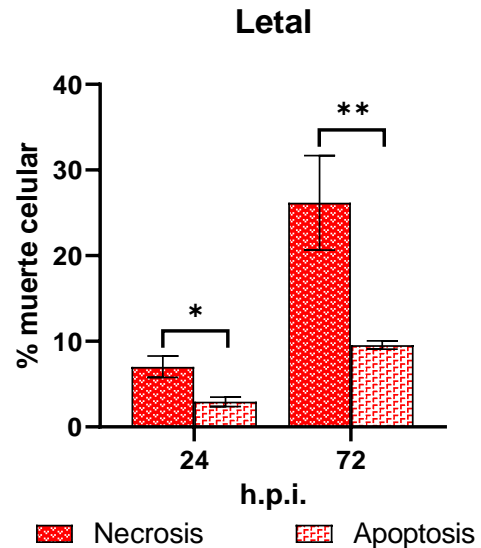


Figura 7. Muerte celular necrótica y apoptótica en el cerebro de ratones recién nacidos con candidosis invasiva neonatal. Animales infectados menores de 24 horas de edad con 1×10^5 (grupo no letal) y 5×10^5 (grupo letal) levaduras de *C. albicans*, así como SSF (grupo vehículo). A) Gráficos de puntos (Dot Plots) representativos de la población del cerebro en general, aquellos eventos 7-AAD⁺ se identificaron como células necróticas, eventos Anexina V⁺/7-AAD⁻ y Anexina V⁺/7-AAD⁺ como células apoptóticas, eventos Anexina V⁻/7-AAD⁻ como células viables. Muerte celular por B) necrosis y C) apoptosis. Comparación entre necrosis y apoptosis en el grupo D) No Letal y E) Letal. *P<0.05 y **P<0.01, calculada mediante las pruebas de Kruskal-Wallis *post hoc* U de Mann-Whitney (datos no pareados), n=5 para cada grupo experimental.

7. DISCUSIÓN

La candidosis sistémica es una de las 3 infecciones más comunes del torrente sanguíneo en pacientes pediátricos principalmente neonatos a pretérmino, y es la más frecuente dentro de los patógenos fúngicos en este grupo de riesgo, alcanzando altos niveles de mortalidad y graves secuelas neurológicas en neonatos que logran sobrevivir ³⁴⁻⁴¹. Se sabe que uno de los sitios de mayor diseminación en el recién nacido es el cerebro, donde los casos clínicos revelan inflamación, así como importantes lesiones granulomatosas y abscesos ^{20,42}. Sin embargo, a pesar de la relevancia de esta enfermedad, es poco lo que se conoce sobre la patogénesis en el cerebro y otros órganos, dado en parte a la dificultad para reproducir infecciones sistémicas en modelos experimentales neonatales. Los primeros modelos animales en ratas y ratones de 2-3 días de edad estuvieron limitados a la atención de órganos como pulmón, hígado, bazo y riñón, en los cuales se observó una correcta diseminación de *C. albicans* tras la inoculación i.v. e i.p., sin embargo, no aportaron información sobre la diseminación a cerebro⁸¹⁻⁸². Apoyado en estos y otros modelos infecciosos, nuestro equipo de trabajo desarrolló un modelo de candidosis diseminada en ratones menores de 24 horas de edad inoculados por vía i.v., recreando de esta manera la infección en recién nacidos a pretérmino, en el cual se observó la diseminación a distintos sitios, destacando el cerebro por ser junto con el hígado el órgano más afectados por la diseminación fúngica así como neuroinflamación, lo que es relevante ya que es similar al cuadro clínico que ocurre en recién nacidos humanos con

candidosis diseminada ⁵⁷. Incluso más recientemente este modelo fue aplicado para la investigación de la respuesta inmune celular, así como el ambiente de citocinas en distintos órganos de diseminación ⁵⁸. Por lo tanto, consideramos este modelo adecuado para el estudio de la patogénesis en el cerebro durante esta enfermedad.

El peso es un importante indicador del bienestar neonatal, anteriormente se ha vinculado en modelos experimentales adultos y neonatos la pérdida de peso con alteraciones neurológicas como resultado de estímulos infecciosos. Para determinar si *C. albicans* afecta el peso de ratones recién nacidos, infectamos a los animales con una concentración letal y no letal de levaduras administrando el hongo directamente al torrente sanguíneo, observando que a partir de las 48 h.p.i. el peso de los animales infectados era menor que el de los ratones del grupo vehículo, además, había una diferencia entre inóculos presentando un peso menor aquellos animales a los que se les administró una concentración letal en comparación con el grupo no letal. Estos resultados coinciden con lo que se ha reportado en modelos infecciosos tanto adultos como neonatales. En un modelo de ratones adultos inmunosuprimidos con corticosteroides realizado por Sanches *et al.* ⁸³, se mostró que la administración i.v. de especies de *Candida* no-*albicans* provocaba disminución del peso adicional al efecto del fármaco, esto acompañado de diseminación al cerebro e inflamación local a los 3 d.p.i. En cuando a modelos neonatales, Andrade *et al.* ⁸⁴ investigaron la infección vertical de *Streptococcus* grupo B en ratones al momento de nacer, observando una reducción en la ganancia del peso corporal desde los 3 hasta los 8 días de vida,

así como diseminación a órganos como pulmones, intestino, hígado y cerebro, en este último con neuroinflamación, activación de la microglía y muerte celular, además, aquellos animales que sobrevivieron presentaron discapacidades en el desarrollo neurológico. Por otro lado, Cardoso *et al.* ⁸⁵ estudiaron el efecto de la administración diaria i.p. del LPS en ratones de 4 días de edad, lo que condujo a una reducción aguda en el peso corporal y cerebral, con una sólida respuesta inflamatoria, activación de la microglía y astrogliosis. Se sabe que el apetito está regulado por vías de señalización en el cerebro principalmente el hipotálamo ⁸⁶, donde se secretan polipéptidos que estimulan el apetito y donde se encuentran los receptores de grelina, por lo que alteraciones en esta región podrían resultar en hipofagia y pérdida de peso. Por lo tanto, creemos que el efecto de la candidosis invasiva en el peso de los animales infectados se debe en parte a alteraciones neurológicas resultantes de la invasión de *C. albicans* al cerebro, sin embargo, se debe considerar el posible efecto de la diseminación a otros órganos como hígado, pulmones o sistema digestivo.

Dado al papel que desempeña diseminación de patógenos al SNC en el bienestar neonatal, nos propusimos evidenciar la invasión fúngica, así como el infiltrado celular a tiempos tempranos en el cerebro de ratones recién nacidos. El análisis de cargas fúngicas reveló la presencia de *C. albicans* desde 1 h.p.i. en ambos grupos infectados, sin embargo, la invasión al parénquima cerebral ocurrió a las 6 h.p.i. en el grupo letal con predominio de levaduras, mientras que en el grupo no letal se encontraron estructuras fúngicas principalmente filamentos hasta las 12 h.p.i. Anteriormente Lionakis *et al.* ⁶⁴ ya había demostrado la presencia de *C.*

albicans en el cerebro de ratones adultos mediante carga fúngica a 1 h.p.i., sin embargo, no se realizaron estudios para determinar la invasión al parénquima cerebral en este tiempo, sino que únicamente se evidenció histológicamente a partir de 1 d.p.i. En otros modelos adultos distintos a la candidosis tales como la infección con *Cryptococcus neoformans*, se encontró la presencia del hongo desde 1 h.p.i. mediante la administración i.v. al determinar la carga fúngica ⁸⁷, y a través de la vía intranasal a las 3 h.p.i. mediante cargas fúngicas e histología ⁸⁸. Hasta donde sabemos, no existen estudios a tiempos tempranos que muestren la diseminación al cerebro de agentes infecciosos en modelos neonatales, por lo que nuestros resultados aportan valiosas bases para comprender mejor la inmunopatogénesis en este órgano.

Se sabe que *C. albicans* presenta diversos factores de virulencia tales como transición morfológica, expresión de adhesinas e invasinas, formación de biopelículas y secreción de enzimas hidrolíticas, los cuales favorecen la invasión tisular ocasionando daño en el sitio ⁸⁹. Sin embargo, poco es lo que se conoce sobre el papel que desempeñan los factores de virulencia de *C. albicans* en la invasión al cerebro. Liu *et al.* ⁵⁹ sugirieron que *C. albicans* podría cruzar la BHE mediante un mecanismo de transcitosis, lo que involucra la interacción de adhesinas e invasinas como Als3 y Ssa1 con receptores del endotelio cerebral. Interesantemente, Drummond *et al.* ⁹⁰ encontraron que la infección con una cepa mutante de *C. albicans* con filamentación deficiente en ratones inmunosuprimidos afectó considerablemente la invasión al SNC, así como el reclutamiento de neutrófilos. En cuanto a otros órganos, en el modelo de ratas de 2-3 días de

edad descrito por Trofa *et al.* ⁸¹, se estudió una cepa mutante de *C. albicans* no productora de lipasa 8 (LIP8), la cual disminuyó su capacidad de invasión hígado, bazo y riñón, en comparación con la cepa salvaje. En otro modelo de ratones de 2 días de edad propuesto por Csonka *et al.* ⁹¹, se empleó una cepa mutante de *C. parapsilopsis och1Δ/Δ*, la cual presenta alteraciones en la cadena externa de manano en la pared celular, encontrando atenuada la diseminación a órganos como bazo, riñón e hígado, pero no en cerebro. Estudiar la participación de los factores de virulencia en la invasión al cerebro será necesario en futuras investigaciones apuntando a una mejor comprensión de la enfermedad y búsqueda de tratamientos mas oportunos.

Por otro lado, la infiltración celular ocurrió a partir de las 24 h.p.i, formando posibles estructuras de contención de apariencia granulomatosa formada por células predominantemente PMN además de MN. Lo anterior ya se había observado en el trabajo realizado por Flores-Maldonado ⁵⁷ cuando estableció un modelo neonatal de candidosis diseminada murina, posteriormente Wu *et al.* ⁶³ encontraron la presencia de estructuras similares en un modelo murino de candidosis en adultos al administrar una cantidad baja de levaduras. Lossinsky *et al.* ⁹², estudiaron el efecto de la inoculación intracerebral de *C. albicans* en ratas de 4-10 días de edad observado infiltración con predominio de neutrófilos, así como necrosis asociada al tejido adyacente. Un estudio realizado por Yao *et al.* ⁹³ en ratones de 10 días de edad sometidos a HI combinada con LPS, mostró la atenuación de la lesión cerebral ocasionada por el estímulo tras un tratamiento profiláctico con anticuerpo anti- Ly6G que redujo el número de neutrófilos en el

sitio. Con base en esto, la participación de células infiltrantes en el cerebro de ratones neonatos con candidosis diseminada podría tener un papel neuroprotector cooperando a la solución de la infección, o por el contrario, una respuesta desregulada podría estar involucrada en el daño tisular y promover la gravedad de la enfermedad.

Observamos que tanto la diseminación como el infiltrado se presentaron a lo largo de las regiones del cerebro (prosencéfalo, mesencéfalo y telencéfalo), por lo que realizamos un análisis semicuantitativo del grado de invasión, así como de infiltración celular en las diferentes subregiones anatómicas del cerebro. Tanto la invasión como el infiltrado presentaron tendencias similares de incrementar en relación con el tiempo siendo en grado mayor cuando se administró un inóculo letal. Las subregiones que presentaron diferencias fueron el hipocampo, corteza cerebral, bulbo olfatorio, cuerpo caloso, subpalio central, hipotálamo, placa alar, placa basal, puente de Varolio y cerebelo, mientras que el tálamo y el bulbo raquídeo presentaron invasión e infiltración en grado severo con ambos inóculos. El grado de invasión en las subregiones cuando se administró el inóculo no letal coincidió en gran medida con la irrigación en estas ⁹⁴, mientras que cuando en el grupo infectado con la concentración letal la invasión fue más difusa de manera severa en casi todas las subregiones, por lo que posiblemente el torrente sanguíneo tenga un papel importante en el grado de diseminación dentro del órgano, logrando establecerse la infección de manera más rápida cuando la cantidad de levaduras administradas es alta.

Por otra parte, se sabe que en el cerebro humano las subregiones del prosencéfalo están asociadas, aunque no exclusivamente, a funciones cognitivas y conductuales tales como lenguaje, memoria, razonamiento, función visual y auditiva ⁹⁵⁻⁹⁶. Kondo *et al.* ⁹⁷ estudiaron en un modelo roedor el efecto de la isquemia transitoria en el prosencéfalo, la cual ocasionó muerte de células neuronales, lo que resultó en alteraciones cognitivas tales como lento aprendizaje y pérdida de memoria a corto y largo plazo. A su vez, se ha informado que en el hipotálamo, mesencéfalo y rombencéfalo se controlan funciones que son vitales tales como la sed, apetito, frecuencia cardiaca, actividad motora voluntaria, respiración, digestión o deglución ⁹⁵⁻⁹⁶. Bellot *et al.* ⁹⁸ investigaron las funciones del tronco encefálico, compuesto por el mesencéfalo, puente de Varolio, bulbo raquídeo y cerebelo, utilizando un modelo de encefalopatía provocada por HI en ratones de 7 días de edad, observando que estas alteraciones provocaron disminución del peso, así como defectos en el control motor, alimentación, succión, deglución y respiración. En recién nacidos humanos, el daño en el tronco encefálico severo ocasionado por HI es considerado un importante predictor de muerte, mientras que un alto porcentaje de niños que logran sobrevivir presentan problemas de alimentación ⁹⁹⁻¹⁰⁰. Nuestros resultados sugieren un importante daño en el tronco encefálico e hipotálamo provocado por la invasión e infiltración en estas regiones, lo que concuerda en conjunto con la disminución del peso en los animales infectados. Queda pendiente por esclarecer las posibles secuelas neurológicas en los animales recién nacidos con la candidosis diseminada empleando ensayos cognitivos, conductuales, motores, entre otros.

La neurodegeneración mediada por inflamación puede resultar no únicamente de la disfunción de células inmunes exógenas, sino la participación celular endógena también es clave en estos eventos. Una de las principales células endógenas que provocan la inflamación es la microglía, con base en esto, decidimos determinar el efecto de la infección fúngica en la activación de esta estirpe celular. Los resultados mostraron la activación de la microglía en ambos grupos experimentales, sin embargo, esta ocurrió primeramente al utilizar una cantidad alta de levaduras. En cuando a modelos de candidosis invasiva en adultos, previamente se había observado la activación de la microglía a los 4 d.p.i. mediante la expresión de marcadores tales como Iba1 y MHCII ^{64,76}. Por su parte, Gandhi *et al.* ¹⁰¹ infectaron una línea celular de microglía (CHME-3) con *C. albicans*, provocando su activación y una mayor expresión de TLR-2 con un perfil de citocinas proinflamatorio. Algunos estudios sugieren la activación de la microglía como respuesta a la expresión de factores de virulencia de *C. albicans*, por ejemplo, Wu *et al.* ⁶³ encontraron que el estímulo de la línea celular de microglía BV-2 favorece su activación y producción de citocinas proinflamatorias, mientras que Drummond *et al.* ⁹⁰, tanto en estudios *in vivo* e *in vitro*, demostraron la activación de la microglía con producción de IL-1 β y CXCL1 tras el empleo de una cepa mutante de candidalislina y estímulos con este polipéptido. Además, Serdar *et al.* ¹⁰² propusieron una posible participación clave de la microglía en la neurodegeneración, esto mediante un modelo de ratas de 7 días de edad tras una lesión cerebral ocasionada por HI y sensibilizada con LPS, polarizándose en un fenotipo proinflamatorio. Interessantemente, Christensen *et al.* ¹⁰³ mostraron que la inhibición de la activación de la microglía resulta en una reducción del

tamaño de las lesiones cerebrales hasta en un 79%, esto tras una inyección intracerebral de LPS en ratones de 2 días de vida. Por lo anterior sugerimos que, la temprana activación de la microglía tras la inoculación letal de *C. albicans* al torrente sanguíneo, podría estar favoreciendo el daño cerebral. La actividad de la microglía también puede involucrar la producción de radicales libres tales como especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico, que pueden participar en el daño cerebral, además, otras estirpes pudieran estar participando durante la inmunopatogénesis de la candidosis en el cerebro, tal es el caso de los astrocitos, que también pueden a través de TLRs detectar señales de lesión e infección y responder secretando citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento, desencadenando la respuesta inmune, sin embargo queda pendiente demostrar esto ^{74, 104}.

En vista de que tanto la invasión de *C. albicans* en el parénquima cerebral, así como la infiltración y la actividad de la microglía están ligadas al daño del SNC, determinamos el tipo de muerte celular que podría estar ocurriendo. Los resultados mostraron que tanto la necrosis como la apoptosis ocurrieron simultáneamente, y mientras que la apoptosis fue igual en ambos grupos de animales infectados, la necrosis fue mayor en el grupo infectado con la concentración letal. Además, interesantemente se observó que en los ratones del grupo no letal la necrosis solo predominó a las 24 h.p.i., mientras que a las 72 h.p.i. los niveles de necrosis y apoptosis se mantuvieron en equilibrio, a diferencia del grupo letal, donde la necrosis siempre fue el principal tipo de muerte en el cerebro. Lo anterior sugiere que mientras la necrosis podría estar involucrada en

el daño y agravamiento de la enfermedad, la apoptosis pudiera estar asociada al menos a un mejor pronóstico. Es sabido que, las agresiones moderadas desencadenan principalmente muerte celular regulada como la apoptosis, necroptosis o autofagia, en contraste con las agresiones graves, las cuales provocan muerte celular accidental y desregulada principalmente necrótica ¹⁰⁵. La necrosis puede comenzar a tiempos tempranos tal como se observó al utilizar ambos inóculos, ya que desde que *C. albicans* ingresa a los vasos sanguíneos del cerebro, puede ocasionar lisis de las células endoteliales con algunas lesiones necróticas locales ^{60,106}. Además, se ha estudiado el efecto perjudicial que podría tener la muerte necrótica en células de la microglía, Pais *et al.* ¹⁰⁷ utilizaron cultivos primarios de microglía con el fin de estudiar el efecto de neuronas necróticas sobre la respuesta inflamatoria de la microglía y su neurotoxicidad, observando que las neuronas necróticas indujeron la activación de la microglía caracterizada por una sobreexpresión de MHCII, CD11b, citocinas proinflamatorias y óxido nítrico sintasa, lo que en efecto aumentó su neurotoxicidad. En cuanto a la apoptosis, se sabe que algunos componentes de *C. albicans* inducen este tipo de muerte programada en algunas células tales como epitelio oral, pulmonar y macrófagos murinos ¹⁰⁸, sin embargo, esto no ha sido reportado en el cerebro. Coimbra-Costa *et al.* ¹⁰⁹ demostraron el importante papel del estrés oxidativo en la inducción de apoptosis, esto en un modelo de ratas de HI, tras lo cual se encontraron altos niveles de NO y radicales libres en el cerebro, acompañado de una disminución de los sistemas de defensa antioxidantes, observando mayores niveles tras el estímulo de HI aun después de condiciones de normoxia. Nuestros resultados se limitan a la muerte celular

de la población generalizada del cerebro, y no muestran cómo es la muerte en las diferentes estirpes celulares tales como las neuronas, por lo que en un futuro será necesario realizar investigaciones al respecto.

Los datos del presente proyecto muestran importantes eventos neurológicos tempranos como resultado de la invasión fúngica al cerebro, tales como infiltración celular, activación de la microglía y muerte celular, lo que en conjunto se ve reflejado en la salud y el peso de los ratones recién nacidos, con diferencias en el rumbo de la infección cuando se administra un inóculo alto o bajo. Este trabajo provee una base para el entendimiento sobre la patogénesis durante la candidosis invasiva neonatal en el cerebro, lo cual ayudará próximas investigaciones a comprender mejor eventos posteriores y a buscar nuevos blancos terapéuticos para el control de la enfermedad.

8. CONCLUSIONES

- Los animales recién nacidos con candidosis diseminada presentan alteraciones en el peso en comparación con los animales no infectados.
- *C. albicans* en cerebro se detecta a tiempos tempranos, sin embargo, la invasión al parénquima cerebral sucede primeramente en los ratones infectados con un inóculo letal, con posterior infiltración celular en ambos grupos experimentales.
- La invasión fúngica y la infiltración es diferencial en las distintas regiones y subregiones anatómicas del cerebro, y más grave cuando se administra un inóculo letal.
- La gravedad de la invasión fúngica e infiltración celular en hipotálamo, mesencéfalo y rombencéfalo podrían contribuir a la muerte de los animales debido a alteraciones en las funciones vitales como respiración, ritmo cardíaco y alimentación.
- La microglía presenta una activación más rápida cuando se administra un inóculo alto de levaduras.
- La necrosis fue el principal tipo de muerte en el grupo infectado con la concentración letal, mientras que en el grupo no letal se presentó un equilibrio entre apoptosis y necrosis.
- La invasión fúngica, infiltración celular y/o activación de la microglía podrían ser causantes de la muerte celular, y esta a su vez, podría estar potenciando la activación de la microglía y agravando los efectos de la infección.

9. PERSPECTIVAS

- Estudiar los factores de virulencia de *C. albicans* que podrían favorecer la invasión y el daño cerebral.
- Determinar la muerte celular de las distintas poblaciones en las regiones y subregiones anatómicas del cerebro.
- Investigar la participación de otras estirpes celulares en la patogénesis.
- Evaluar los efectos de la activación de la microglía tales como la producción de citocinas, quimiocinas y radicales libres
- Analizar las posibles secuelas neurológicas y su impacto en el desarrollo en el grupo sobreviviente empleando ensayos cognitivos y conductuales.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Dignani, M. C., Solomkin, J. S., & Anaissie, E. J. (2009). *Candida*. Clinical Mycology, 197–229.
2. Thompson, D. S., Carlisle, P. L., & Kadosh, D. (2011). Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. Eukaryotic cell, 10(9), 1173–1182.
3. ElFeky, D., Gohar, N., El-Seidi, E., Ezzat, M., & AboElew, S. (2015). Species identification and antifungal susceptibility pattern of *Candida* isolates in cases of vulvovaginal candidiasis. Alexandria Journal of Medicine. 52.
4. Sudbery, P., N. Gow, and J. Berman. (2004). The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. Trends Microbiol. 12:317–324
5. Odds, F. C. (1988). *Candida* and candidosis. Baillie`re Tindall, London, United Kingdom
6. Sudbery, P. E. (2001). The germ tubes of *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae show different patterns of septin ring localization. Mol. Microbiol. 41:19–31.
7. Dadar M, Tiwari R, Karthik K, Chakraborty S, Shahali Y, Dhama K. *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control - An update. Microb Pathog. 2018 Apr;117:128-138.
8. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaüer MA. (2011). Microbiología Médica. 8a Edición. ELSEVIER. Pp. 779-787

9. da Silva Dantas, A., Lee, K. K., Raziunaite, I., Schaefer, K., Wagener, J., Yadav, B., & Gow, N. A. (2016). Cell biology of *Candida albicans*-host interactions. *Current opinion in microbiology*, 34, 111–118.
10. Castrillón RLE, Palma RA, Padilla DC. Factores de virulencia en *Candida* sp. *Dermatol Revista Mexicana*. 2005;49(1):12-27.
11. Ciurea, C. N., Kosovski, I. B., Mare, A. D., Toma, F., Pinteá-Simon, I. A., & Man, A. (2020). *Candida* and Candidiasis-Opportunism Versus Pathogenicity: A Review of the Virulence Traits. *Microorganisms*, 8(6), 857.
12. Kumamoto CA, Vines MD. (2005). Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cellular Microbiology*,
13. Cassone, A., Vecchiarelli, A., & Hube, B. (2016). Aspartyl Proteinases of Eukaryotic Microbial Pathogens: From Eating to Heating. *PLoS pathogens*,
14. Schaller, M., Borelli, C., Korting, H. C., & Hube, B. (2005). Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*, 48(6), 365–377.
15. Moyes, D. L., Wilson, D., Richardson, J. P., Mogavero, S., Tang, S. X., Wernecke, J., Höfs, S., Gratacap, R. L., Robbins, J., Runglall, M., Murciano, C., Blagojevic, M., Thavaraj, S., Förster, T. M., Hebecker, B., Kasper, L., Vizcay, G., Iancu, S. I., Kichik, N., Häder, A., ... Naglik, J. R. (2016). Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. *Nature*,
16. Ho, J., Wickramasinghe, D. N., Nikou, S. A., Hube, B., Richardson, J. P., & Naglik, J. R. (2020). Candidalysin Is a Potent Trigger of Alarmin and Antimicrobial Peptide Release in Epithelial Cells. *Cells*, 9(3), 699.
17. Ho, J., Yang, X., Nikou, S. A., Kichik, N., Donkin, A., Ponde, N. O., Richardson, J. P., Gratacap, R. L., Archambault, L. S., Zwirner, C. P., Murciano, C., Henley-

- Smith, R., Thavaraj, S., Tynan, C. J., Gaffen, S. L., Hube, B., Wheeler, R. T., Moyes, D. L., & Naglik, J. R. (2019). Candidalysin activates innate epithelial immune responses via epidermal growth factor receptor. *Nature communications*, 10(1), 2297.
- 18.** Whaley, S. G., Berkow, E. L., Rybak, J. M., Nishimoto, A. T., Barker, K. S., & Rogers, P. D. (2017). Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-albicans *Candida* Species. *Frontiers in microbiology*, 7, 2173.
- 19.** Uppuluri P., Khan A., Edwards J.E. (2017) Current Trends in Candidiasis. In: Prasad R. (eds) *Candida albicans: Cellular and Molecular Biology*. Springer, Cham.
- 20.** Schuster, J.E., & Fisher B.T. (2021). Candidiasis. *Pediatric Transplant and Oncology Infectious Diseases*, 195-205.e3.
- 21.** Arenas-Guzmán, R. (2019). *Micología Médica Ilustrada*. 6a Edición. Ciudad de México, México. McGraw-Hill Interamericana Editores, S. A. de C. V.
- 22.** Benitez-Ojeda AB, Mendez MD. Diaper Dermatitis. [Updated 2020 Oct 1]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan.
- 23.** Bonifaz, A., Rojas, R., Tirado-Sánchez, A., Chávez-López, D., Mena, C., Calderón, L., & María, P. O. (2016). Superficial Mycoses Associated with Diaper Dermatitis. *Mycopathologia*, 181(9-10), 671–679.
- 24.** Basmacıyan, L., Bon, F., Paradis, T., Lapaquette, P., & Dalle, F. (2019). "*Candida albicans* Interactions With The Host: Crossing The Intestinal Epithelial Barrier". *Tissue barriers*, 7(2), 1612661.
- 25.** Kumamoto C. A. (2011). Inflammation and gastrointestinal *Candida* colonization. *Current opinion in microbiology*, 14(4), 386–391.

- 26.** R AN, Rafiq NB. Candidiasis. [Updated 2020 Nov 20]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan.
- 27.** J. Peman, E. Canton, G. Quindos, E. Eraso, J. Alcoba, J. Guinea, P. Merino, M.T. Ruiz-Perez-de-Pipaon, L. Perez-del-Molino, M.J. Linares-Sicilia, F. Marco, J. Garcia, E.M. Rosello, G.d.-I.-P.E. Gomez, N. Borrell, A. Porras, G. Yague, and F.S. Group, Epidemiology, species distribution and in vitro antifungal susceptibility of fungaemia in a Spanish multicentre prospective survey. *J Antimicrob Chemother* 67 (2012) 1181-7.
- 28.** Pappas, P. G., Lionakis, M. S., Arendrup, M. C., Ostrosky-Zeichner, L., & Kullberg, B. J. (2018). Invasive candidiasis. *Nature reviews. Disease primers*, 4, 18026.
- 29.** A.S. Chitnis, S.S. Magill, J.R. Edwards, T.M. Chiller, S.K. Fridkin, and F.C. Lessa, Trends in *Candida* central line-associated bloodstream infections among NICUs, 1999-2009. *Pediatrics* 130 (2012) e46-52.
- 30.** Zhan, L., Huang, L., Qu, J., Zhong, C., & Lü, X. (2015). Analysis of clinical characteristics in 122 adult patients with candidemia. *Zhonghua yi xue za zhi*, 95(33), 2690–2694.
- 31.** Izquierdo, G., & Santolaya, M. E. (2014). Candidiasis invasoras en recién nacidos: diagnóstico, tratamiento y prevención [Invasive candidiasis in newborns: diagnosis, treatment and prophylaxis]. *Revista chilena de infectologia : organo oficial de la Sociedad Chilena de Infectologia*, 31(1), 73–83.

- 32.** Mora Carpio AL, Climaco A. Fungemia Candidiasis. [Updated 2020 Aug 12]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan.
- 33.** Kullberg, B. J., & Arendrup, M. C. (2015). Invasive Candidiasis. The New England journal of medicine, 373(15), 1445–1456.
- 34.** Larru, B., Gong, W., Vendetti, N., Sullivan, K. V., Localio, R., Zaoutis, T. E., & Gerber, J. S. (2016). Bloodstream Infections in Hospitalized Children: Epidemiology and Antimicrobial Susceptibilities. The Pediatric infectious disease journal, 35(5), 507–510.
- 35.** J. Fu, X. Wang, B. Wei, Y. Jiang, and J. Chen, Risk factors and clinical analysis of candidemia in very-low-birth-weight neonates. Am J Infect Control 44 (2016) 1321-1325.
- 36.** A. Tragiannidis, C. Tsoulas, and A.H. Groll, Invasive candidiasis and candidaemia in neonates and children: update on current guidelines. Mycoses 58 (2015) 10-21.
- 37.** G. Aguilar, C. Delgado, I. Corrales, A. Izquierdo, E. Gracia, T. Moreno, E. Romero, C. Ferrando, J.A. Carbonell, R. Borrás, D. Navarro, and F.J. Belda, Epidemiology of invasive candidiasis in a surgical intensive care unit: an observational study. BMC Res Notes 8 (2015) 491.
- 38.** Rejane P. Neves, Ana Maria R. de Carvalho Parahym, Carolina M. da Silva, Danielle P.C. Macêdo, André F.G. Leal, Henrique J. Neves and Reginaldo G. Lima-Neto (December 20th 2017). Fungal Infections in Neonatal Intensive Care, Selected Topics in Neonatal Care, R. Mauricio Barría, IntechOpen,

- 39.**Caparó Ingram, E., Vásquez Vega, M., Norero, X., Sáez-Llorens, X., DeAntonio, R., & Rodríguez Barría, E. (2019). Factores de riesgo y letalidad asociados a candidemia neonatal en una unidad de neonatología [Risk factors and lethality associated with neonatal candidemia in a neonatal unit]. *Revista chilena de pediatría*, 90(2), 186–193.
- 40.**Botero-Calderon, L., Benjamin, D. K., Jr, & Cohen-Wolkowicz, M. (2015). Advances in the treatment of invasive neonatal candidiasis. Expert opinion on pharmacotherapy, 16(7), 1035–1048.
- 41.**Greenberg, R. G., & Benjamin, D. K., Jr (2014). Neonatal candidiasis: diagnosis, prevention, and treatment. *The Journal of infection*, 69 Suppl 1(0 1), S19–S22.
- 42.**Pahud, B. A., Greenhow, T. L., Piecuch, B., & Weintrub, P. S. (2009). Preterm neonates with candidal brain microabscesses: a case series. *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association*, 29(4), 323–326.
- 43.**D.K. Benjamin, Jr., B.J. Stoll, M.G. Gantz, M.C. Walsh, P.J. Sanchez, A. Das, S. Shankaran, R.D. Higgins, K.J. Auten, N.A. Miller, T.J. Walsh, A.R. Laptook, W.A. Carlo, K.A. Kennedy, N.N. Finer, S. Duara, K. Schibler, R.L. Chapman, K.P. Van Meurs, I.D. Frantz, 3rd, D.L. Phelps, B.B. Poindexter, E.F. Bell, T.M. O'Shea, K.L. Watterberg, R.N. Goldberg, H. Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child, and N. Human Development Neonatal Research, Neonatal candidiasis: epidemiology, risk factors, and clinical judgment. *Pediatrics* 126 (2010) e865-73.

- 44.** S. Basha, N. Surendran, and M. Pichichero, Immune responses in neonates. *Expert Rev Clin Immunol* 10 (2014) 1171-84.
- 45.** Yu, J. C., Khodadadi, H., Malik, A., Davidson, B., Salles, É., Bhatia, J., Hale, V. L., & Baban, B. (2018). Innate Immunity of Neonates and Infants. *Frontiers in immunology*, 9, 1759.
- 46.** Melville, J. M., & Moss, T. J. (2013). The immune consequences of preterm birth. *Frontiers in neuroscience*, 7, 79.
- 47.** Li, Y. P., Yu, S. L., Huang, Z. J., Huang, J., Pan, J., Feng, X., Zhang, X. G., Wang, J. H., & Wang, J. (2015). An impaired inflammatory cytokine response to gram-negative LPS in human neonates is associated with the defective TLR-mediated signaling pathway. *Journal of clinical immunology*, 35(2), 218–226.
- 48.** Yerkovich, S. T., Wikström, M. E., Suriyaarachchi, D., Prescott, S. L., Upham, J. W., & Holt, P. G. (2007). Postnatal development of monocyte cytokine responses to bacterial lipopolysaccharide. *Pediatric research*, 62(5), 547–552.
- 49.** Nussbaum, C., Gloning, A., Pruenster, M., Frommhold, D., Bierschenk, S., Genzel-Boroviczény, O., von Andrian, U. H., Quackenbush, E., & Sperandio, M. (2013). Neutrophil and endothelial adhesive function during human fetal ontogeny. *Journal of leukocyte biology*, 93(2), 175–184.
- 50.** Tsafaras, G. P., Ntontsi, P., & Xanthou, G. (2020). Advantages and Limitations of the Neonatal Immune System. *Frontiers in pediatrics*, 8, 5.
- 51.** Zhu, J., Zhang, H., Guo, T., Li, W., Li, H., Zhu, Y., & Huang, S. (2014). Quantitative proteomics reveals differential biological processes in healthy

- neonatal cord neutrophils and adult neutrophils. *Proteomics*, 14(13-14), 1688–1697.
- 52.**Guilmot, A., Hermann, E., Braud, V. M., Carlier, Y., & Truysens, C. (2011). Natural killer cell responses to infections in early life. *Journal of innate immunity*, 3(3), 280–288.
- 53.**Kollmann TR, Kampmann B, Mazmanian SK, Marchant A, Levy O. Protecting the Newborn and Young Infant from Infectious Diseases: Lessons from Immune Ontogeny. *Immunity*. 2017 Mar 21;46(3):350-363.
- 54.**Walker JC, Smolders MA, Gemen EF, Antonius TA, Leuvenink J, de Vries E. Development of lymphocyte subpopulations in preterm infants. *Scand J Immunol*. 2011 Jan;73(1):53-8.
- 55.**Strunk T, Currie A, Richmond P, Simmer K, Burgner D. Innate immunity in human newborn infants: prematurity means more than immaturity. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2011 Jan;24(1):25-31.
- 56.**H. Ledford, Eye-opening picture of fetal immune system emerges. *Nature* 546 (2017) 335-336.
- 57.**Flores-Maldonado O.E. (2017). Establecimiento de un modelo murino de candidosis diseminada neonatal (Tesis de maestría). Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.
- 58.**Flores-Maldonado O.E. (2021). Respuesta inmune innata órgano-específica en un modelo murino de candidosis diseminada neonatal (Tesis de doctorado). Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.

- 59.** Liu, Y., Mittal, R., Solis, N. V., Prasadaraao, N. V., & Filler, S. G. (2011). Mechanisms of *Candida albicans* trafficking to the brain. PLoS pathogens, 7(10), e1002305.
- 60.** Navarathna, D. H., Munasinghe, J., Lizak, M. J., Nayak, D., McGavern, D. B., & Roberts, D. D. (2013). MRI confirms loss of blood-brain barrier integrity in a mouse model of disseminated candidiasis. NMR in biomedicine, 26(9), 1125–1134.
- 61.** Koutsouras, G. W., Ramos, R. L., & Martinez, L. R. (2017). Role of microglia in fungal infections of the central nervous system. Virulence, 8(6), 705–718.
- 62.** Karve, I. P., Taylor, J. M., & Crack, P. J. (2016). The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. British journal of pharmacology, 173(4), 692–702.
- 63.** Wu, Y., Du, S., Johnson, J. L., Tung, H. Y., Landers, C. T., Liu, Y., Seman, B. G., Wheeler, R. T., Costa-Mattioli, M., Kheradmand, F., Zheng, H., & Corry, D. B. (2019). Microglia and amyloid precursor protein coordinate control of transient *Candida* cerebritis with memory deficits. Nature communications, 10(1), 58.
- 64.** M.S. Lionakis, J.K. Lim, C.C. Lee, P.M. Murphy. Organ-specific innate immune responses in a mouse model of invasive candidiasis. J Innate Immun (2011); 3(2):180-199
- 65.** M. Falck, D. Osredkar, R.T. Wood, et al. Neonatal Systemic Inflammation Induces Inflammatory Reactions and Brain Apoptosis in a Pathogen-Specific Manner. Neonatology (2018); 113(3):212-220.

- 66.** Wang X, Rousset CI, Hagberg H, Mallard C. Lipopolysaccharide-induced inflammation and perinatal brain injury. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2006 Oct;11(5):343-53.
- 67.** Liu Y, Silverstein FS, Skoff R, Barks JD. Hypoxic-ischemic oligodendroglial injury in neonatal rat brain. *Pediatr Res.* 2002 Jan;51(1):25-33.
- 68.** Wang X, Svedin P, Nie C, Lapatto R, Zhu C, Gustavsson M, Sandberg M, Karlsson JO, Romero R, Hagberg H, Mallard C. N-acetylcysteine reduces lipopolysaccharide-sensitized hypoxic-ischemic brain injury. *Ann Neurol.* 2007 Mar;61(3):263-71.
- 69.** Du X, Fleiss B, Li H, D'angelo B, Sun Y, Zhu C, Hagberg H, Levy O, Mallard C, Wang X. Systemic stimulation of TLR2 impairs neonatal mouse brain development. *PLoS One.* 2011 May 6;6(5):e19583.
- 70.** Wang, L. W., Chang, Y. C., Lin, C. Y., Hong, J. S., & Huang, C. C. (2010). Low-dose lipopolysaccharide selectively sensitizes hypoxic ischemia-induced white matter injury in the immature brain. *Pediatric research*, 68(1), 41–47.
- 71.** Mirabelli-Badenier M, Braunersreuther V, Lenglet S, Galan K, Veneselli E, Viviani GL, Mach F, Montecucco F. Pathophysiological role of inflammatory molecules in paediatric ischaemic brain injury. *Eur J Clin Invest.* 2012 Jul;42(7):784-94.
- 72.** Lai JCY, Svedin P, Ek CJ, et al. Vancomycin Is Protective in a Neonatal Mouse Model of *Staphylococcus epidermidis*-Potentiated Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020;64(3):e02003-19. Published 2020 Feb 21.

- 73.**Algra SO, Groeneveld KM, Schadenberg AW, et al. Cerebral ischemia initiates an immediate innate immune response in neonates during cardiac surgery. *J Neuroinflammation*. 2013;10:24. Published 2013 Feb 7.
- 74.**Li B, Concepcion K, Meng X, Zhang L. Brain-immune interactions in perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Prog Neurobiol*. 2017;159:50-68.
- 75.**Kienstra KA, Freysdottir D, Gonzales NM, Hirschi KK. Murine neonatal intravascular injections: modeling newborn disease. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2007;46(6):50-54.
- 76.**Maneu V, Noailles A, Megías J, et al. Retinal microglia are activated by systemic fungal infection. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55(6):3578-3585. Published 2014 May 15.
- 77.**Mirza MA, Ritzel R, Xu Y, McCullough LD, Liu F. Sexually dimorphic outcomes and inflammatory responses in hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Neuroinflammation*. 2015;12:32. Published 2015 Feb 20.
- 78.**Puntambekar SS, Hinton DR, Yin X, et al. Interleukin-10 is a critical regulator of white matter lesion containment following viral induced demyelination. *Glia*. 2015;63(11):2106-2120.
- 79.**Garcia-Bonilla L, Racchumi G, Murphy M, Anrather J, Iadecola C. Endothelial CD36 Contributes to Postischemic Brain Injury by Promoting Neutrophil Activation via CSF3. *J Neurosci*. 2015;35(44):14783-14793.
- 80.**Brandenburg S, Turkowski K, Mueller A, Radev YT, Seidlitz S, Vajkoczy P. Myeloid cells expressing high level of CD45 are associated with a distinct activated phenotype in glioma. *Immunol Res*. 2017;65(3):757-768.

- 81.** Trofa D, Soghier L, Long C, Nosanchuk JD, Gacser A, Goldman DL. A rat model of neonatal candidiasis demonstrates the importance of lipases as virulence factors for *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*. *Mycopathologia*. 2011;172(3):169-178.
- 82.** Tsai NY, Laforce-Nesbitt SS, Tucker R, Bliss JM. A murine model for disseminated candidiasis in neonates. *Pediatr Res*. 2011;69(3):189-193.
- 83.** Sanches, M. D., Mimura, L., Oliveira, L., Ishikawa, L., Garces, H. G., Bagagli, E., Sartori, A., Kurokawa, C. S., & Fraga-Silva, T. (2019). Differential Behavior of Non-*albicans* *Candida* Species in the Central Nervous System of Immunocompetent and Immunosuppressed Mice. *Frontiers in microbiology*, 9, 2968.
- 84.** Andrade EB, Magalhães A, Puga A, et al. A mouse model reproducing the pathophysiology of neonatal group B streptococcal infection. *Nat Commun*. 2018;9(1):3138. Published 2018 Aug 7.
- 85.** Cardoso FL, Herz J, Fernandes A, et al. Systemic inflammation in early neonatal mice induces transient and lasting neurodegenerative effects. *J Neuroinflammation*. 2015;12:82. Published 2015 Apr 29.
- 86.** Rui L. Brain regulation of energy balance and body weight. *Rev Endocr Metab Disord*. 2013;14(4):387-407.
- 87.** Charlier C, Nielsen K, Daou S, Brigitte M, Chretien F, Dromer F. Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*. 2009;77(1):120-127.

- 88.** Coelho C, Camacho E, Salas A, Alanio A, Casadevall A. Intranasal Inoculation of *Cryptococcus neoformans* in Mice Produces Nasal Infection with Rapid Brain Dissemination. *mSphere*. 2019;4(4):e00483-19. Published 2019 Aug 7.
- 89.** Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2), 119–128.
- 90.** Drummond RA, Swamydas M, Oikonomou V, et al. CARD9+ microglia promote antifungal immunity via IL-1 β - and CXCL1-mediated neutrophil recruitment. *Nat Immunol*. 2019;20(5):559-570.
- 91.** Csonka K, Vadovics M, Marton A, et al. Investigation of OCH1 in the Virulence of *Candida parapsilosis* Using a New Neonatal Mouse Model. *Front Microbiol*. 2017;8:1197. Published 2017 Jun 30.
- 92.** Lossinsky AS, Jong A, Fiala M, Mukhtar M, Buttle KF, Ingram M. The histopathology of *Candida albicans* invasion in neonatal rat tissues and in the human blood-brain barrier in culture revealed by light, scanning, transmission and immunoelectron microscopy. *Histol Histopathol*. 2006;21(10):1029-1041.
- 93.** Yao HW, Kuan CY. Early neutrophil infiltration is critical for inflammation-sensitized hypoxic-ischemic brain injury in newborns. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2020;40(11):2188-2200.
- 94.** Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, et al., editors. *Neuroscience*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2001. The Blood Supply of the Brain and Spinal Cord.
- 95.** Onken M, Berger S, Kristian T. Simple model of forebrain ischemia in mouse. *J Neurosci Methods*. 2012;204(2):254-261.

- 96.** Ackerman S. Discovering the Brain. Washington (DC): National Academies Press (US); 1992. 2, Major Structures and Functions of the Brain.
- 97.** Kondo T, Yoshida S, Nagai H, et al. Transient forebrain ischemia induces impairment in cognitive performance prior to extensive neuronal cell death in Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). J Vet Sci. 2018;19(4):505-511.
- 98.** Bellot B, Peyronnet-Roux J, Gire C, Simeoni U, Vinay L, Viemari JC. Deficits of brainstem and spinal cord functions after neonatal hypoxia-ischemia in mice. Pediatr Res. 2014;75(6):723-730.
- 99.** Martinez-Biarge M, Diez-Sebastian J, Kapellou O, et al. Predicting motor outcome and death in term hypoxic-ischemic encephalopathy. Neurology. 2011;76(24):2055-2061.
- 100.** Martinez-Biarge M, Diez-Sebastian J, Wusthoff CJ, et al. Feeding and communication impairments in infants with central grey matter lesions following perinatal hypoxic-ischaemic injury. Eur J Paediatr Neurol. 2012;16(6):688-696.
- 101.** Gandhi J, Naik P, Kaur I, Kumar A, Joseph J. Microglial Response to *Aspergillus flavus* and *Candida albicans*: Implications in Endophthalmitis. J Fungi (Basel). 2020;6(3):162. Published 2020 Sep 5.
- 102.** Serdar M, Kempe K, Rizazad M, et al. Early Pro-inflammatory Microglia Activation After Inflammation-Sensitized Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Neonatal Rats. Front Cell Neurosci. 2019;13:237. Published 2019 May 24.
- 103.** Christensen LB, Woods TA, Carmody AB, Caughey B, Peterson KE. Age-related differences in neuroinflammatory responses associated with a distinct

- profile of regulatory markers on neonatal microglia. *J Neuroinflammation*. 2014;11:70. Published 2014 Apr 4.
- 104.** Rama Rao KV, Kielian T. Neuron-astrocyte interactions in neurodegenerative diseases: Role of neuroinflammation. *Clin Exp Neuroimmunol*. 2015;6(3):245-263.
 - 105.** Thornton C, Leaw B, Mallard C, Nair S, Jinnai M, Hagberg H. Cell Death in the Developing Brain after Hypoxia-Ischemia. *Front Cell Neurosci*. 2017;11:248. Published 2017 Aug 23.
 - 106.** Góralska K, Blaszkowska J, Dzikowiec M. Neuroinfections caused by fungi. *Infection*. 2018;46(4):443-459.
 - 107.** Pais TF, Figueiredo C, Peixoto R, Braz MH, Chatterjee S. Necrotic neurons enhance microglial neurotoxicity through induction of glutaminase by a MyD88-dependent pathway. *J Neuroinflammation*. 2008;5:43. Published 2008 Oct 9.
 - 108.** Camilli G, Blagojevic M, Naglik J, Richardson JP. Programmed Cell Death: Central Player in Fungal Infections. *Trends Cell Biol*. 2021;31(3):179-1
 - 109.** Coimbra-Costa D, Alva N, Duran M, Carbonell T, Rama R. Oxidative stress and apoptosis after acute respiratory hypoxia and reoxygenation in rat brain. *Redox Biol*. 2017;12:216-225.